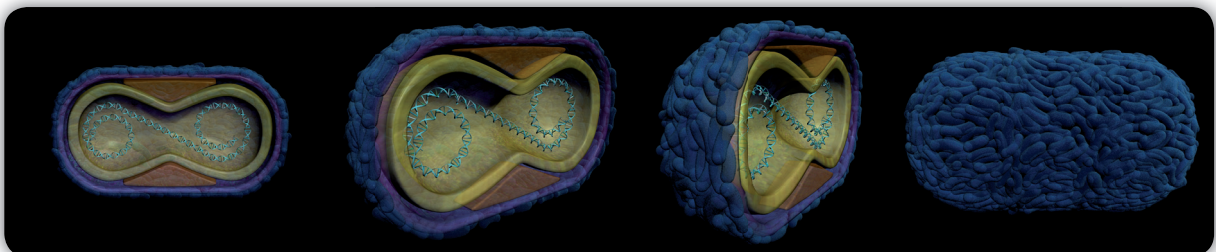




Mutantes replicativos y atenuados del virus vaccinia  
como candidatos vacunales  
frente a la leishmaniasis



Memoria presentada por **D. Lucas Sánchez Sampedro**  
para optar al grado de Doctor en Biología Molecular  
por la Universidad Autónoma de Madrid



El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del **Centro Nacional de Biotecnología** del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid) bajo la dirección de **Mariano Esteban Rodríguez** y **Carmen Elena Gómez Rodríguez**, gracias a una beca predoctoral FIS (Formación Investigación Sanitaria).





A mi familia

en el sentido más amplio de la palabra



*«La ciencia médica hace prodigios en los hospitales y se acerca el día en que habrá barrido definitivamente con los variados gérmenes, microbios y virus que nos obligan a aislarnos en sus blancas salas protectoras. Lo único que la ciencia no conseguirá vencer jamás son las miguitas de pan.»*

**Julio Cortázar**

«Observaciones Inquietantes»; Papeles Inesperados.

*«La suerte es el lugar en el que la preparación encuentra su oportunidad.»*

**Amy Hempel**

«Celia ha vuelto»; Cuentos Completos.

*«Vivimos nuestras vidas basándonos en historias. Historias sobre ser irlandés o ser negro. Sobre trabajar duro o inyectarse heroína. Ser hombre o mujer. Y nos pasamos la vida buscando pruebas –datos y testimonios– que apoyen nuestras historias.»*

**Chuck Palahniuk**

«Realidad o Ficción»; Error Humano.



## ■ Agradecimientos

### [Antecedentes]

Dios creó el mundo en 7 días pero a **mis padres** les costó un poquito más sacarme adelante. Hicieron bien en meterme en un colegio religioso porque afianzó mis inquietudes científicas y me dejaron irme pronto de casa porque aprendería mucho de la confianza que me regalaban. Ellos dirán que han hecho lo que han podido y yo que esta tesis nunca habría sido posible sin ellos, sin su cariño ni sin su educación. Gracias por traerme de la mano hasta aquí y por dejar a *ese-apoyo-constante* que es mi hermana manteniéndome siempre bien arriba. **Hermanita**, también a ti, gracias.

Uno fuera de casa tiene dudas y por eso, mientras estudiaba la carrera, **José María Pi-queras** me abrió la puerta de su despacho, y me ayudó a elegir para terminar haciendo lo que quería hacer: investigar. Y él tenía razón y yo mucho que agradecerle ahora mismo. José María, muchas gracias.

Mi padrino **Juan Segura** fue, junto con mis padres, de las personas que más motivaron mis inquietudes científicas. No le bastó con regalarme casi todos los libros de divulgación científica que tengo, sino que además me dio la dirección del laboratorio de Mariano Esteban para que fuera a llamar a su puerta. *Es una buena puerta*, decía. Lo que yo no sabía es que llamaría y me quedaría casi 7 años. Muchas gracias Juan. Tú también tenías razón; era una buena puerta.

### [Laboratorio 112]

A **Mariano Esteban** tengo que agradecerle muchas cosas. La primera el abrirme la puerta y animarme a que me quedara. La segunda es su confianza para dejarme hacer lo que más me gustaba y la tercera, la libertad para escoger cómo llevarlo a cabo. Tres líneas para tres cosas importantísimas. Muchas gracias por todo ello Mariano y gracias también a **Chogüi** por todo lo que me ha ayudado y por todas las risas en las comidas de laboratorio.

**Carmencita**, agárrate. Gracias por hacerme sentir como en mi canaria casa con tus *qué-pasó-mi-cielo*, *cuéntame-cariño* y *eso-no-es-problema-ya-veremos-cómo-pero-lo-arreglamos*. Por tus *ya-viene-el-niño-con-cara-de-miedda* o *papi-no-te-pongas-sabroso*. Por todas las discusiones acaloradas vacías de paciencia y llenas de cariño en las que soportar mi intransigente cabezonería y resignarte con tu *si-vas-a-hacer-lo-que-te-dé-la-gana-pa-qué-me-preguntas*. Y, mientras tanto, me enseñaste toda la ciencia que sé. Carmen, he aprendido MUCHÍSIMO a tu lado. Y no solo de ciencia. Dicen que madre no hay más que una y es cierto, porque la segunda que yo tengo es extracomunitaria y no cuenta. Muchísimas pero que muchísimas gracias.

Como no podía dar la lata solo a una persona, me busqué a las tres personas más capaces del mundo para enseñarme. **Magdalena Krupa** a.k.a *krupi* me enseñó la dureza del perfeccionismo de la forma más divertida y paciente posible. Siempre que hago un gel perfecto me acuerdo de ti, polaca. **Jose Luis Nájera**, no sé cómo llevan los trámites de adopción tus padres, pero has sido para mí como un hermano, lo hagamos legal o no. Por tu corazón, tu sentido del humor, tu paciencia y tus consejos: mil gracias. **Beatriz Perdiguero** a.k.a *Perdi*,

que sepas que Sampedro a.k.a yo mismo, es mucho mejor persona desde que te conoce. Gracias por estar siempre ahí. Siempre. De día y de noche. Por aconsejarme con cosas del laboratorio y de fuera de él. Gracias por tu apoyo incondicional. Gracias.

Otra persona que siempre estuvo de día y de noche fue **Ana Cáceres**. Porque una tesis no es una tesis si no luchas mano a mano con alguien para seguir adelante. Porque la vida del laboratorio se comenta mucho mejor tras unas copas a las tantas. Creo que nos hemos ahorrado muchas horas de psicólogo juntos. Y, aunque no todos los recuerdos serán buenos, no nos pueden quitar lo *bailao*. Muchas gracias Anita.

No todos los laboratorios vienen de serie con personas con macutos llenos de historias y de aventuras, pero **Juanito** trajo uno y nos las contó todas. Algunas hasta varias veces. Y yo ahora sé que el Elbrus está en Rusia, que los masais no tienen pelos en los brazos y que el Aconcagua tiene casi 7000 metros. Gracias por demostrarme día a día que las cosas se consiguen con esfuerzo y, a veces, poniéndose una camisa. Lo que sí tienen todos los laboratorios son guiris, y nosotros tuvimos la mala suerte de que nos tocara un italiano. Un italiano que le pone corazón a todo lo que hace y es puro nervio. Un tío noble y de principios como los que se encuentran pocos. Gracias **Mauro** por dejarme formar parte de tu familia de expatriados y por una botella de ron que no olvidaré nunca, porque significaba mucho. Ah y también nos ha tocado un hindú con quién he tenido el placer de aprender de otras culturas y de colaborar a ratos. **Aneesh** a ti también, gracias.

Un día Mariano, supongo que antes de tomarse un café, pensó que era buena idea que el chico *asustao* que estaba en la puerta del laboratorio esperando su primer día de laboratorio chispas se pusiera a trabajar conmigo. Que le enseñaría algo y bien. Yo no os sabría decir bien si aprendió de mí o venía *aprendío*, pero yo he aprendido muchísimo de **Ernesto Mejías**. Y creo que le he puesto la cabeza como un bombo contándole mi vida entera mientras le explicaba cómo iba esto de pipetear. Ernesto, mil gracias por hacer más divertido todo esto (y por los productos de Molina, vinos incluidos), por ser un tipo *espabilao*, trabajador y brillante. Te lo he dicho mil veces, vales muchísimo y sé que algún día presumiré de haberte enseñao algo.

Cuando eres una persona *un pelín* salvaje siempre viene bien tener a alguien de la misma calaña al lado para no llamar la atención. El problema es que con **Rubén** pasaba lo contrario. Rubén, mil gracias por potenciar lo peor que hay en mí. Por todas las risas que nos echamos. Me llego a reír un poco más y me cambia el metabolismo. Por tu culpa o por la de **Inés**, una persona que siempre me ayudó tanto y me demostró tanto cariño que hasta quiere ser mi suegra. Gracias por hacer realmente felices los años que estuviste con nosotros. Eres una de las personas más divertidas que he conocido nunca y eso hace mucha falta tenerlo cerca. **Mariví** os está cogiendo el relevo y creo que va a ser esencial para seguir haciendo el salvaje sin vosotros, así que, Mariví, gracias.

Y si me olvido de darle las gracias a **Socorro** me muero. Soco, has sido mis buenos días con una sonrisa durante siete años y eso no se olvida nunca. Eres de ese tipo de personas que se echa mucho de menos cuando se van de vacaciones por lo imprescindibles en el día a día. Y porque eres de las personas más sabias y que mejores consejos da de todo el departamento.

### [El exilio]

Un día tuve a bien hacer la mili en forma de estancia, porque me sobraban 8 kilos y decidí que New Haven era un buen sitio para perderlos. Creo que de todos los científicos que he conocido **Diane McMahon-Pratt** es de las personas a las que más respeto intelectualmente. Es como la Espasa-Calpe de la Biología Molecular y la parasitología con patas. Aprendí muchísimo a tu lado, así que Diane, muchísimas gracias por darme la oportunidad de que en mi bar favorito presuman de un cliente que llegó a Yale. Diane me puso con **Allison**, mi compañera infatigable de despacho que aguantó al español que habló *más-en-inglés-que-ella-en-toda-su-vida* y la persona que me ayudó enormemente a sobrevivir en yankilandia. A **Karen** por enseñarme lo que es ser Lab Manager, por tenerlo todo en su sitio y enseñarme a ser un *wicked New England Boy*. A **Karen Adele** por el intercambio cultural adolescente y por hacer todo lo posible para que no me aburriera en una ciudad aburrida. Por enseñarme que la gente de Carolina del Norte escucha *country* en *streaming* con el iphone en la poyata. A Tiago le debo salir en mi rescate en días de experimentos que salieron realmente mal. Y por suscribirme a la lista de estudiantes internacionales en la que conseguí comprarme un nórdico calentito y conocer a personas que hicieron que no muriera de frío -porque me metieron en un bar- llamadas Marta y Carlos, amigos que hice lejos, que parece que siempre estarán lejos pero que extrañamente siento bien cerca.

### [Fuera del Laboratorio: La Vida Real <sup>TM</sup>]

Gracias a **María** y **Maite** por ser amigas inseparables con las que contar siempre *pa tó*. A **Felix Gallego** y a **Carlos Bricio** porque juntos comerse el mundo no siempre tiene que ser un sueño. A **Beatriz García** y a **Rosa García-Verdugo** por darme motivos para querer salir corriendo del laboratorio para veros. Por el tiempo que estuvimos juntos. Gracias.

A Belén, Miguel, Cristina, Juan, Jaime, Lucas, Andrea, Ana, Alex y Guzmán, porque me apadrinasteis cuando llegué a Madrid y todavía seguimos dando guerra junto con Miguel Puig, Juan Freijo, Paula, Eduardo, Pablo y una interminable lista de impresentables.

A Roberto García, por dejar este trabajo sin viudas ni huérfanas y sangrar cosas que no eran animales.

Ana Guarner por su apoyo incondicional pretésico y culinario.

A Patricia Fernández de Lis, Oscar Menéndez y Pampa Molina, por enseñarme a hacer periodismo y dejarme un *huequito* de papel en un diario junto con todos los profesionales de Público Ciencia –Manuel Ansedé, Ainhoa Irriberri, Daniel Mediavilla, Javier Salas, Nuño Domínguez, Marta del Amo y Maximiliano Corredor. Por enseñarme a contar la ciencia que hacemos. Por enseñarme, sobre todo, que a alguien le interesa lo que hacemos. Y por el sobresueldo.

Por último a todos y cada uno de los LeftOver Lights, porque es cojonudo rascar una guitarra con vosotros al lado. A ver si un día salimos de pobres y me sacáis de un laboratorio.

Gracias a todos por hacer de estos años de tesis, por ahora, los mejores años de mi vida. A todos: GRACIAS.

## ■ Abreviaturas

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**APC:** alofocianina

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**ASL:** antígeno soluble de *Leishmania*

**ATP:** adenosina trifosfato

**BCA:** ácido bicínico

**BCG:** bacilo Calmette-Guerin

**BCR:** receptor de células B

**BSA:** albúmina de suero bovina

**BWA:** *Burrows-Wheeler Alignment*

**CD4:** diferenciador de grupo 4

**CD8:** diferenciador de grupo 8

**CEF:** fibroblastos embrionarios de pollo

**CFSE:** carboxifluoresceína diacetato succinil éster

**CTL:** linfocitos T citotóxicos

**DAB:** 3,3'-diaminobenzidina tetrahydrochloride

**DMEM:** medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**ELISA:** *enzyme linked immunosorbent assay*

**ELISPOT:** *enzyme linked immunospot assay*

**EV:** virus envuelto

**FCS:** suero fetal de ternera

**FITC:** isotiocianato de fluoresceína

**FML:** ligando manosa fucosa

**h.p.i.:** horas post-infección

**HA:** hemaglutinina

**H/E:** hematoxilina/eosina

**i.d.:** intradérmico

**i.p.:** intraperitoneal

**IFN:** interferón

**IgG:** inmunoglobulina G

**IL:** interleuquina

**INDEL :** inserciones/deleciones

**iNOS:** óxido nítrico sintetasa inducible

**IRES:** sitio interno de entrada al ribosoma

**ITR:** *Internal Terminal Repeat*

**KDa:** kilodalton

**Kg:** kilogramo

**Kpb:** kilo pares de bases

**LACK:** *Leishmania homolog of receptors for activated C kinase*

**LACK<sub>157-173</sub>:** péptido de la proteína LACK que comprende los aminoácidos 157 a 173

**LACKp24:** fracción de 24 KDa de la proteína LACK

**LB:** medio Luria-Bertani

**LC:** leishmaniasis cutánea

**LCD:** leishmaniasis cutánea difusa

**LMC:** leishmaniasis mucocutánea

**LPG:** lipofosfoglicano

**LUC:** luciferase

**LV:** leishmaniasis visceral

**M65:** mutante 65

**M101:** mutante 101

**mg:** miligramo

**MHC:** complejo principal de histocompatibilidad

**ml:** mililitro

**MIDGE:** *minimalistic immunogenically defined gene expression*

**mM:** milimolar



<b>mm:</b> milímetro	<b>PNA:</b> lectina de cacahuete ( <i>Peanut agglutinin</i> )
<b>mg:</b> microgramo	<b>ROS:</b> especies reactivas de oxígeno
<b>mM:</b> micromolar	<b>rpm:</b> revoluciones por minuto
<b>mm:</b> micrometro	<b>SAM:</b> <i>sequence alignment map</i>
<b>MV:</b> virus maduro	<b>SD:</b> desviación estandar
<b>MVA:</b> virus modificado de Ankara	<b>SDS:</b> dodecil sulfato sódico
<b>NCS:</b> suero de ternera recién nacida	<b>SDS-PAGE:</b> electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>NK:</b> células citolíticas naturales, <i>Natural killer</i>	<b>SIDA:</b> síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>nm:</b> nanómetro	<b>SIV:</b> virus de la inmunodeficiencia en simios
<b>OMS:</b> Organización mundial de la salud	<b>SNP:</b> polimorfismo de nucleótido simple
<b>ON:</b> óxido nítrico	<b>SPRD:</b> spectral red
<b>P<sub>7.5</sub>:</b> promotor viral sintético temprano/tardío	<b>TCA:</b> ácido tricloroacético
<b>PAMPs:</b> patrones moleculares asociados a patógenos	<b>TCR:</b> receptor de células T
<b>PBS:</b> tampón fosfato salino	<b>TGF:</b> factor de crecimiento tumoral
<b>PBS-BSA:</b> PBS + 1% BSA	<b>Th:</b> linfocito T colaborador ( <i>T helper</i> )
<b>PBST:</b> PBS + 0,05% Tween-20	<b>TK:</b> timidina kinasa
<b>Pcmv:</b> promotor de citomegalovirus	<b>TLR:</b> <i>Toll like receptor</i>
<b>PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa	<b>TMB:</b> 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
<b>PE:</b> ficoeritrina	<b>TNF:</b> factor de necrosis tumoral
<b>PECy5.5:</b> ficoeritrina-cianina 5.5	<b>UFP:</b> unidad formadora de placa
<b>PECy7:</b> ficoeritrina-cianina 7	<b>VIH:</b> virus de la inmunodeficiencia humana
<b>PERCP:</b> peridina-clorofil-proteína	<b>VACV:</b> virus vaccinia
<b>Pe/I:</b> promotor temprano/tardío	<b>WR:</b> <i>western reserve</i>
<b>PKDL:</b> <i>post Kala azar dermal leishmaniasis</i>	<b>WT:</b> <i>wild type</i>
<b>PMA:</b> <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>	<b>WV:</b> wrapped virus



## ■ Summary

Poxvirus vectors have emerged as prominent vehicles for delivering antigens of pathogens to fight against prevalent animal and human diseases. Different strains of vaccinia virus (VACV) expressing antigens from different pathogen-causing diseases are used nowadays in preclinical and clinical trials against HIV, malaria, tuberculosis, leishmaniasis and also in cancer. The most promising vectors used in vaccination trials are the attenuated MVA and NYVAC strains. While those viruses do not produce virus progeny in human cells, which assures safety, some evidences point out that replication competent viruses with limited but amplified time of infection and expression of heterologous antigen could provide more immunogenic vaccines.

In this work we have examined the replication and immunogenic characteristics of two vaccinia virus (VACV) mutants: M65 and M101. These mutants were generated after serial passages of persistently infected Friend erythroleukemia cells (FEL). These mutant viruses are able to replicate in the same cell lines as the parental virus strain although replication is slightly diminished. Recombinant viruses expressing *Photinus pyralis* luciferase gene were generated to study replication and heterologous antigen expression *in vivo*. In those studies, the mutant virus M65-Luc showed similar replication capacity as parental VACV Western Reserve WR-Luc but M101-Luc showed a more restricted phenotype, comparable to MVA-Luc in lymph nodes and spleen; M101-Luc expression persisted longer than MVA-Luc in organs like ovaries or in cells of the peritoneal cavity. In intranasally infected mice the mutants showed different attenuation levels, and pathogenicity was strongly reduced in comparison with the parental WR strain.

Wide genome analysis after deep sequencing revealed that both viruses shared an identical deletion in the left end of the genome comprehending some immunomodulatory but mainly host range genes. The main difference between M65 and M101 genomes is a small deletion in the right end of the genome of M101 virus that is not present in M65 genome, encompassing *A39R*, *A40R* and *WR208* genes. In addition, selective amino acid substitutions in specific viral genes were either maintained or differently introduced in the two mutants.





To further evaluate the potential of M65 and M101 as vaccine vectors against diseases, recombinant viruses expressing the protective *Leishmania* LACK antigen were generated and tested in heterologous DNA prime/poxvirus boost regimen for protective efficacy against leishmaniasis. Mice immunized in DNA prime/poxvirus boost with both vectors expressing the LACK antigen of *Leishmania infantum* resulted, after challenge with *Leishmania major*, in protection or delay in the onset of cutaneous leishmaniasis.

When immune populations were analyzed, high quality CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> LACK-specific T cells were detected in adaptive immune response, at early stages postchallenge and during memory stages. A remarkable difference between M65 and M101 vectors is that DNA-LACK/M65-LACK regimen preferentially induced CD4<sup>+</sup> T cell responses, while DNA-LACK/M101-LACK regimen preferentially induced CD8<sup>+</sup> T cell responses.

Overall, from the replication capacity of M65 and M101 in cells of various origins and in mouse tissues, genome sequences, as well as from the immunogenic characteristics and efficacy of recombinants expressing the LACK antigen of *L. infantum* against leishmaniasis, we propose that M65 and M101 can be considered as novel VACV replication competent strains which can be used as vaccine vectors against pathogens.

<b>1.Introducción</b>	19
<b>1.Poxvirus: aspectos generales</b>	21
<b>2.El Virus Vaccinia (Vacv)</b>	21
2.1. Estructura y Morfología	21
2.2. Organización genómica	22
2.3. Ciclo Infeccioso	23
2.3.1. Entrada	23
2.3.2. Desencapsidación	25
2.3.3. Expresión génica y replicación del ADN	25
2.3.4. Morfogénesis y salida de la progenie	26
<b>3.Los poxvirus como vectores vacunales</b>	26
<b>4.Leishmaniasis</b>	28
4.1. Taxonomía y ciclo vital de Leishmania spp	29
4.2. Tipos de enfermedad y epidemiología	30
4.3. La respuesta inmune frente a Leishmania	32
4.4. Tratamiento de la Leishmaniasis	34
4.4.1. Vacunas	34
<b>5.Protocolo de inmunización heterólogo o prime-boost</b>	36
<b>6.El modelo de ratón balb/c</b>	37
<b>7.El antígeno lack</b>	38
<b>2.Objetivos</b>	41
<b>3.Materiales y métodos</b>	45
<b>1.Materiales Biológicos</b>	47
1.1. Líneas celulares	47
1.2. Medios de cultivo	47
1.3. Obtención de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF)	48
1.4. Bacterias	48
1.5. Leishmania	48
1.6. Virus	48
1.7. Plásmidos	49
<b>2.Reactivos</b>	50
2.1. Anticuerpos	50
2.2. Antígeno soluble de Leishmania (ASL)	51
2.3. Péptido Lack	52

2.4. Oligonucleótidos .....	52
2.5. Tampones .....	52
<b>3. Metodología .....</b>	<b>53</b>
3.1. Manipulación del ADN .....	53
3.1.1. Transfección transitoria de cultivos celulares .....	53
3.1.2. Análisis por PCR .....	53
3.1.3. Purificación de ácidos nucleicos .....	54
3.2. Manipulación de virus .....	55
3.2.1. Generación de los virus vaccinia recombinantes M65-Luc y M101-Luc .....	55
3.2.2. Purificación de virus .....	56
3.2.3. Titulación de virus .....	56
3.2.4. Curvas de crecimiento .....	57
3.3. Manipulación de proteínas .....	57
3.3.1. Purificación de la proteína LACK de <i>L. infantum</i> .....	57
3.3.2. Análisis de las proteínas en SDS-PAGE .....	57
3.3.3. Transferencia de SDS-PAGE e inmunodetección en membrana (Western blot) .....	58
3.4. Técnicas inmunológicas .....	58
3.4.1. Determinación de las células T secretoras de IFN $\gamma$ por el ensayo de ELISPOT .....	58
3.4.2. Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo .....	59
3.4.3. Análisis de proliferación .....	59
3.4.4. Inmunohistoquímica .....	60
3.5. Manipulación con animales .....	60
3.5.1. Protocolos de inmunización .....	60
3.5.2. Obtención de muestras de los animales inmunizados .....	61
3.5.3. Determinación de los niveles de luciferasa <i>ex vivo</i> .....	61
3.5.4. Infección con <i>Leishmania</i> .....	62
3.5.4.1. Mantenimiento de los cultivos de <i>Leishmania spp.</i> .....	62
3.5.4.2. Infección experimental con <i>L. Major</i> .....	62
3.5.4.3. Infección experimental con <i>L. amazonensis</i> .....	62
3.5.4.4. Medida de la lesión en la almohadilla plantar .....	63
3.6. Análisis estadístico .....	63
<b>4. Resultados .....</b>	<b>65</b>
<b>1. Análisis de la capacidad de replicación de los virus mutantes</b>	
<b>M65 y M101 en diferentes líneas celulares .....</b>	<b>67</b>
<b>2. Estudio comparativo del comportamiento <i>in vivo</i> de los virus mutantes</b>	
<b>M65 y M101 .....</b>	<b>68</b>
2.1. Biodistribución de los mutantes M65 y M101 por ruta sistémica .....	68
2.2. Patogenicidad de los virus M65 y M101 en ratones BALB/c .....	70

<b>3. Estudio comparativo de los genomas de los virus mutantes M65 y M101 .....</b>	<b>74</b>
3.1. Características generales de las secuencias genómicas de los virus mutantes .....	74
3.2. Mutaciones en los genomas de los virus M65 y M101.....	75
3.2.1. Mutaciones en genes involucrados en la entrada del virus.....	80
3.2.2. Mutaciones en genes involucrados en morfogénesis tardía y tamaño de placa.....	80
3.2.3. Mutaciones presentes en genes involucrados en defensa del hospedador o modulación de la apoptosis .....	81
3.2.4. Mutaciones en genes involucrados en replicación y transcripción del ADN viral .....	81
<b>4. Los virus mutantes M65 y M101 recombinantes para la proteína LACK de <i>Leishmania infantum</i> son capaces de inducir protección parcial frente a la leishmaniasis cutánea .....</b>	<b>82</b>
4.1. Evaluación de la protección obtenida en el modelo de leishmaniasis cutánea producida por <i>Leishmania major</i> tras la inmunización con M65-LACK o M101-LACK ..	83
4.2. Evaluación de la protección obtenida en el modelo de leishmaniasis cutánea producida por <i>Leishmania amazonensis</i> .....	83
<b>5. Caracterización de las poblaciones celulares inducidas por el protocolo de vacunación heterólogo con ADN y los mutantes M65 y M101 recombinantes para el antígeno LACK de <i>Leishmania infantum</i> .....</b>	<b>86</b>
5.1. Caracterización de la respuesta inmunológica celular adaptativa .....	86
5.2. Caracterización de la respuesta inmunológica celular de memoria .....	89
5.3. Caracterización de las poblaciones celulares inducidas en etapas tempranas tras el desafío con promastigotes metacíclicos de <i>L. major</i> .....	94
5.4. Caracterización de las poblaciones celulares inducidas en etapas tardías tras el desafío con promastigotes metacíclicos de <i>L. major</i> .....	96
 <b>5. Discusión.....</b>	<b>99</b>
1. Caracterización de la capacidad replicativa y atenuación de los virus mutantes ..	101
2. Caracterización del genoma de los virus mutantes .....	103
3. Los virus M65-LACK y M101-LACK como candidatos vacunales frente a la leishmaniasis .....	104
4. Los virus mutantes M65 y M101 estimulan preferentemente distintas poblaciones celulares .....	106
5. Futura Aplicación de los virus M65 y M101 .....	110
 <b>6. Conclusiones .....</b>	<b>111</b>
 <b>7. Bibliografía.....</b>	<b>115</b>
 <b>8. Anexo .....</b>	<b>137</b>

# Introducción

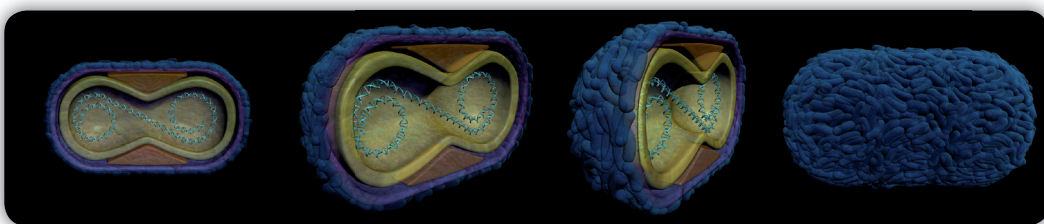
Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

Introducción







## ■ 1. Poxvirus: aspectos generales

Los poxvirus constituyen una familia de virus ADN capaces de infectar tanto vertebrados como invertebrados. El miembro más estudiado de esta familia es el virus vaccinia (VACV) (Dales & Pogo, 1981; Buller & Palumbo, 1991; Moss, 2007) pero, sin duda, el más conocido es el virus de la viruela humana, causante de una de las enfermedades más devastadoras que ha conocido el hombre a lo largo de su historia.

La familia *Poxviridae* engloba el grupo más grande y complejo de los virus ADN, replican íntegramente en el citoplasma de la célula hospedadora, y tienen un origen evolutivo separado de los demás virus ADN (Strauss, 2002). Son virus con ADN de doble cadena que se clasifican en dos subfamilias con once géneros: ocho pertenecen a la subfamilia *Chordopoxvirinae*, la cual infecta vertebrados (aves y mamíferos), y los tres géneros restantes a la subfamilia *Entomopoxvirinae*, que infecta invertebrados (insectos) (Espósito *et al.*, 1977a, b; Li *et al.*, 1998). En general, las especies dentro de un mismo género se diferencian por sus características biológicas, el rango de hospedador y su distribución geográfica (Espósito *et al.*, 1977a, b).

El virus vaccinia es el prototipo de la familia *Poxviridae* y pertenece al género *Orthopoxvirus* de la familia *Chordopoxvirinae*. La infección en humanos es leve, con manifestaciones febriles y aparición de pústulas dérmicas. El VACV fue el primer virus animal visualizado al microscopio electrónico, crecido en cultivos celulares, purificado físicamente y analizado químicamente (Moss, 2007). Como veremos más adelante, la tecnología del ADN recombinante permitió nuevas aplicaciones de los poxvirus en el campo de la inmunología ya que éstos podrían utilizarse como vectores de expresión o como vacunas vivas. Para una revisión en español sobre la familia *Poxviridae* véase el libro «Virus patógenos» (Carrasco, 2006).

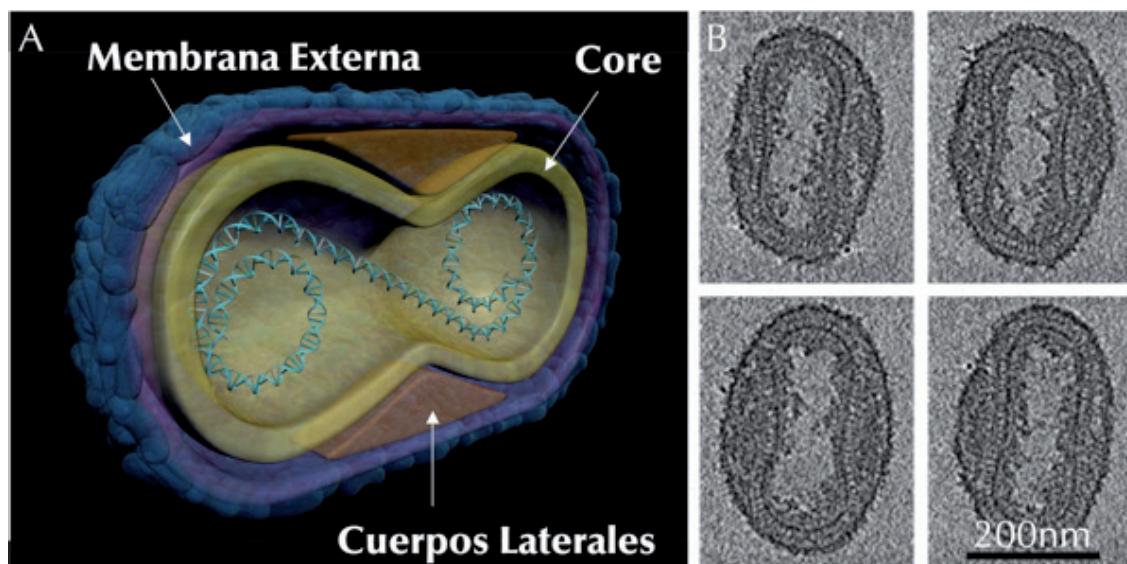
## ■ 2. El Virus Vaccinia (Vacv)

### 2.1. Estructura y Morfología

El virus vaccinia presenta dos tipos de partículas infecciosas; los viriones aislados por rotura celular, denominados viriones maduros (MVs), y los viriones recogidos del medio de cultivo, liberados por la célula infectada sin mediar lisis que reciben el nombre de viriones extracelulares (EVs). Los MVs son altamente estables y se piensa que están involucrados en la transmisión entre huéspedes mientras que los EVs, al tener una frágil membrana, están especializados en transmitirse en el interior de un mismo hospedador (Moss, 2012).

La combinación de criomicroscopía y tomografía electrónica permitió una resolución de la estructura del MV de VACV de 4-6nm (Cyrklaff y cols 2005). La reconstrucción tomográfica mostró que las partículas tenían forma de ladrillo y unas dimensiones de 360 x 270 x 250 nm. Como se muestra en la Figura 1, las partículas estaban rodeadas de una membrana externa lipídica (5-6 nm de grosor), bajo la cual se encontraron dos cuerpos laterales de material heterogéneo sin estructura aparente. El core presentó una cavidad interior con espirales elec-

trodensas de presuntos complejos ADN-proteínas (Jensen *et al.*, 1996), y esta rodeado de dos capas de un grosor de 18-19nm. La primera capa tiene las dimensiones de una membrana lipídica mientras que la capa externa es discontinua, formada por una empalizada periódica de proteínas ancladas en la membrana interna.



**Figura 1.** **A.** Estructura del MV del virus vaccinia. **B.** Secciones de una partícula de la reconstrucción tomográfica del MV (Extraída de Cyrklaff y cols 2005).

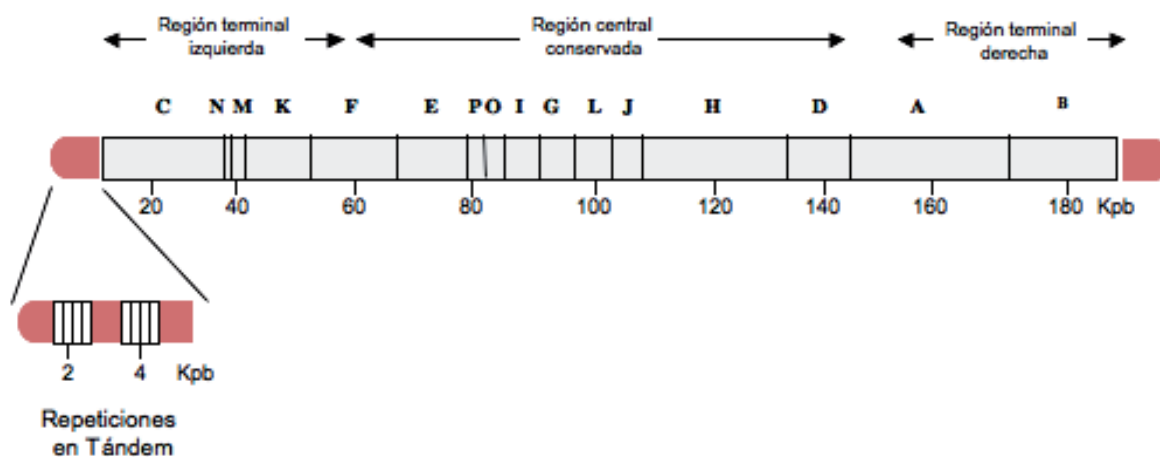
El EV presenta una envuelta lipídica adicional que envuelve al virión maduro (Essani & Dales, 1979; Oie & Ichihashi, 1981a, b) lo que les confiere propiedades estructurales, inmunológicas y funcionales diferentes (Vanderplasschen & Smith, 1997; Roberts & Smith, 2008). Tanto la membrana externa del MV como la envuelta del EV presentan una composición lipídica diferente a la de las membranas de la célula hospedadora y están enriquecidas con proteínas virales diferentes (Stern & Dales, 1974; Anderson & Dales, 1978; Hiller *et al.*, 1981).

## 2.2. Organización genómica

Los poxvirus poseen uno de los genomas más grandes de todos los virus ADN, pudiendo tener un tamaño aproximado de 200 Kpb que codifican para unas 200 proteínas. El genoma del virus vaccinia, de unos 62.3  $\mu$ m (Esteban *et al.*, 1977), consta de una molécula lineal de ADN bicatenario con los extremos unidos covalentemente por estructuras en forma de horquilla que subyacen dentro de una región terminal invertida (ITR, de las siglas en inglés: «Inverted Terminal Repeat»). El ADN tiene un contenido muy alto en A+T y se encuentra asociado a proteínas virales adoptando una conformación superenrollada (Esteban *et al.*, 1977; Soloski & Holowczak, 1981). Hasta la fecha se han secuenciado más de 100 genomas de distintas especies de poxvirus, identificándose al menos unas 100 pautas abiertas de lectura (ORFs: «Open Reading Frames») presentes en todos los *Chordopoxvirus*.

Convencionalmente, la nomenclatura de las pautas de lectura abierta (ORFs) de los *Orthopoxvirus* está basada en la conservación de la distribución de los sitios Hind III en la región central del genoma (Moss, 2007). Esta consiste en asignar la letra del fragmento de ADN

digerido con Hind III, seguida por la posición que ocupa dicha pauta dentro del fragmento (de izquierda a derecha) y de la letra L (Left) o R (Right) dependiendo de la dirección de transcripción. Los genes localizados en la región central del genoma se encuentran altamente conservados dentro de la familia *Poxviridae* y están implicados en funciones esenciales como la replicación o el ensamblaje viral. Sin embargo, los genes situados en los extremos del genoma y que codifican una serie de proteínas involucradas en la interacción con la célula hospedadora y en los mecanismos de evasión del sistema inmune, se encuentran menos conservados (Moss, 2007) (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura y organización del genoma del virus vaccinia (VACV).

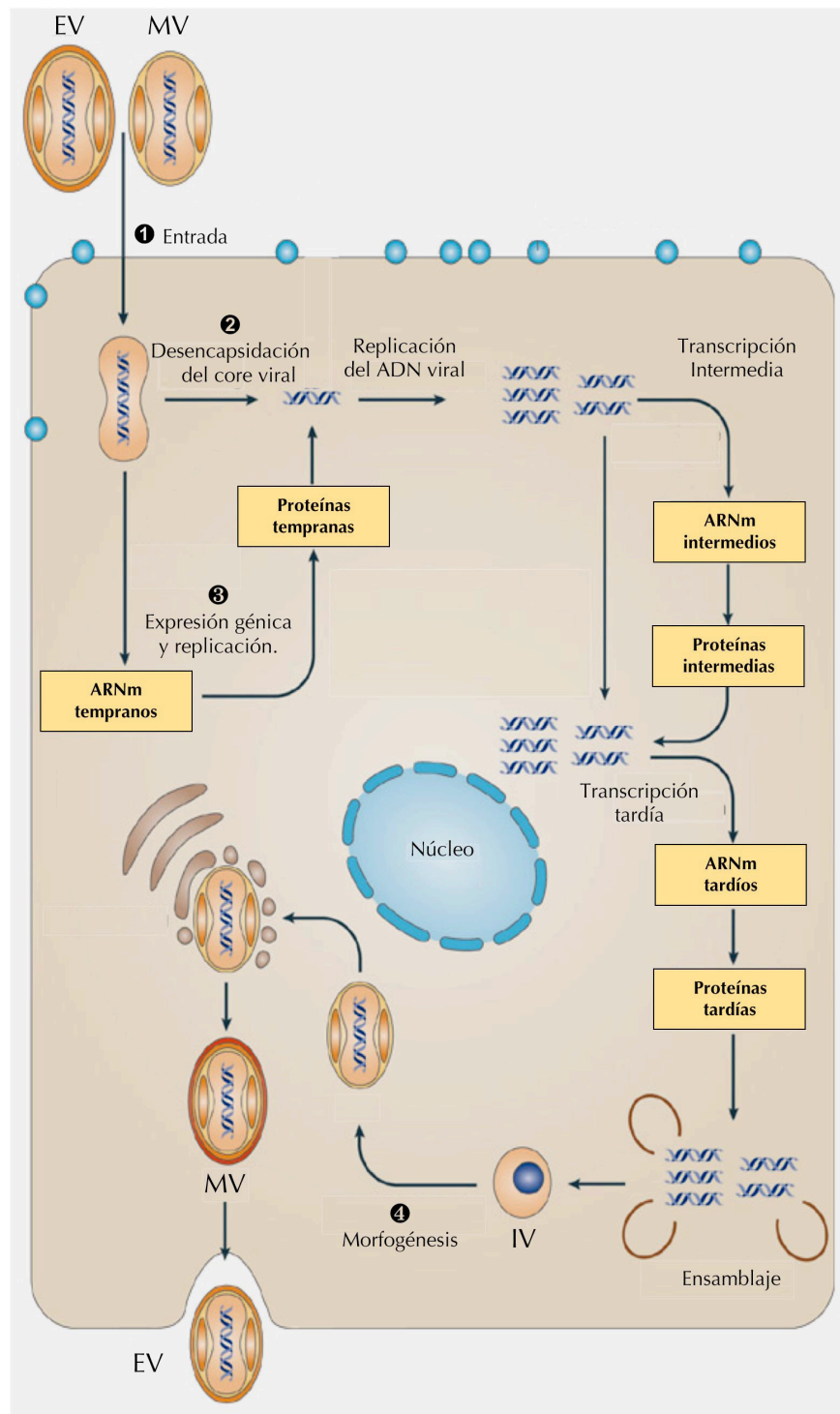
## 2.3. Ciclo Infeccioso

Una de las características que distingue a los Poxvirus de otros virus ADN es que permanece en el citoplasma durante todo el ciclo infeccioso, desde su entrada en la célula hasta que la progenie viral sale a través de la membrana plasmática, sintetizando sus propias enzimas (ADN y ARN polimerasa), lo que le confiere cierta independencia de la célula. El ciclo infeccioso del virus vaccinia es el mejor caracterizado de todos los poxvirus y se divide en 4 etapas: entrada, desencapsidación, expresión génica y replicación del ADN viral y finalmente morfogénesis y salida de la progenie viral (Figura 3).

### 2.3.1. Entrada

El proceso infeccioso se inicia con la unión del virión a la membrana. El estudio de este proceso en el virus vaccinia se ha visto dificultado por la existencia de dos formas infectivas (MV y EV). Debido a la complejidad del virión, en el proceso de entrada tienen que intervenir varias proteínas cuya función aún no ha sido asignada. De hecho, el virus vaccinia tiene un amplio tropismo y aún no se ha descrito un receptor celular específico para poxvirus (Moss, 2012). Existen cuatro proteínas virales asociadas a la membrana del MV que facilitan la unión de los viriones a glicosaminoglicanos (D8, A27 y H3) o a laminina (A26) situados en la superficie de la célula (Moss, 2012). En el caso de los EV no se han descrito proteínas de unión hasta la fecha. La entrada puede ocurrir por fusión con la membrana plasmática o mediante endosomas acidificados tras un evento de macropinocitosis e incluye modificaciones en la dinámica de la actina y señalización celular.

Independientemente de la vía o de la forma del virión (MV o EV), la fusión es dependiente de 11 ó 12 proteínas virales transmembrana no glicosiladas cuyos tamaños varían de los 4 a los 43 kDa y que están asociadas formando un complejo, denominado complejo de entrada (Moss, 2012).



**Figura 3. Ciclo infeccioso del virus vaccinia (VACV).** Figura adaptada de McFadden, 2005 (McFadden, 2005).

### 2.3.2. Desencapsidación

Una vez en el interior, los *cores* experimentan un proceso de desensamblaje que no conlleva una desintegración completa de su estructura, sino más bien una permeabilización. Este proceso está caracterizado, en una primera etapa, por la pérdida de lípidos y proteínas del virión (Dales, 1965) y, en una segunda etapa, por una mayor accesibilidad del genoma a la acción de las nucleasas de ADN exógenas (Sarov & Joklik, 1972).

### 2.3.3. Expresión génica y replicación del ADN

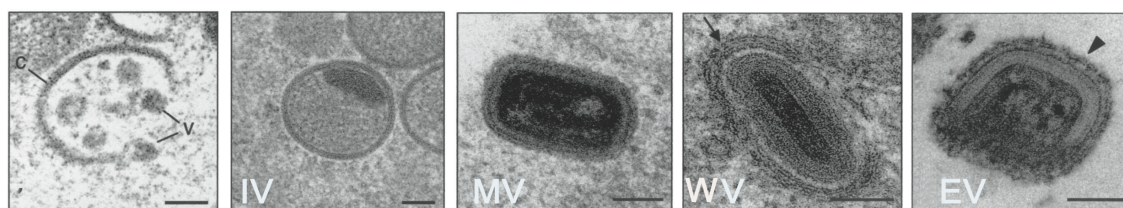
La expresión génica del virus vaccinia se caracteriza por ser un proceso en cascada en el que se distinguen 3 fases de síntesis de ARN mensajeros y de proteínas virales que se diferencian temporalmente en tempranas, intermedias y tardías (Broyles, 2003). El análisis más reciente de la expresión génica de la cepa WR del VACV sugiere que existen 118 genes tempranos, 53 intermedios y 38 tardíos (Yang *et al.*, 2011).

- **Expresión de genes tempranos:** Los mensajeros tempranos aparecen a los pocos minutos después de la entrada del virus en la célula ya que todas las enzimas, factores de transcripción y proteínas necesarias para la síntesis de estos mensajeros se encuentran empaquetados en el *core* del virión. Durante esta fase se transcribe más de la mitad del genoma viral que codifica proteínas que intervienen en la modulación de los mecanismos de defensa de la célula, en la replicación del ADN y en la transcripción de genes intermedios.
- **Replicación del ADN viral:** La replicación viral tiene lugar en áreas del citoplasma denominadas factorías virales y ocurre durante las dos primeras horas después de la entrada del virus. Se generan unas 10000 copias del genoma por célula de las que sólo la mitad llegan a empaquetarse. Todas las evidencias sugieren que no existe un origen específico de replicación viral y que las moléculas de ADN de la progenie proceden de la generación y posterior resolución de largos concatémeros (Moss, 2007). El proceso de replicación se inicia por la introducción de un corte en una de las cadenas, dejando así un extremo 3' libre para iniciar la incorporación de desoxirribonucleótidos. La molécula replicada de ADN se vuelve sobre sí misma para copiar el genoma restante. De este modo, se forman concatémeros por replicación a través del bucle terminal, pudiéndose formar grandes concatémeros ramificados antes de su separación. Después de la transcripción de los genes tardíos se generan moléculas lineales de ADN viral con los extremos sellados y con secuencias invertidas y complementarias (Traktman, 1991). El ADN así producido se acumula en las factorías para luego ser empaquetado y dar lugar a la formación de las partículas virales.
- **Expresión de genes intermedios:** Después de la replicación del ADN y antes de que se expresen los genes tardíos, tiene lugar la transcripción de una serie de genes llamados intermedios. Estos genes codifican los factores necesarios para la transcripción de los genes tardíos.
- **Expresión de genes tardíos:** La transcripción de los genes tardíos, localizados mayoritariamente en la región central del genoma, se inicia después de la expresión de los genes intermedios, entre las 2-3 horas después del inicio de la infección, y continúa a lo largo del proceso infeccioso. Los genes tardíos codifican proteínas estructurales del virión así como las enzimas necesarias para la transcripción de genes tempranos que se incorporan al virión.



### 2.3.4. Morfogénesis y salida de la progenie

Una vez replicado el ADN y sintetizadas todas las proteínas virales, comienza el proceso de morfogénesis. Como hemos descrito previamente, existen dos formas infectivas del virus vaccinia que se diferencian en el número de membranas que adquieren de la célula infectada. Así, en el proceso de formación de las partículas infecciosas hay una serie de estadios intermedios que incluyen la adquisición de estas membranas (Figura 4). A diferencia de otros virus ADN, VACV replica y se ensambla en unos compartimentos perinucleares localizados en el citoplasma denominados factorías virales o virosomas.



**Figura 4. Morfogénesis del virus vaccinia.** Microscopía electrónica de las distintas formas virales que se producen en células HeLa durante el ciclo infeccioso de la cepa Western Reserve (VACV-WR) del virus vaccinia. Figura adaptada de Gallego-Gómez y cols., 2003 (Gallego-Gomez et al., 2003).

La morfogénesis comienza con la formación de crestas membranosas alrededor de un material electrondenso que contiene el ADN viral y las proteínas del *core*, dando lugar a la formación de formas esféricas denominadas virus inmaduros (IVs, «Immature Virus»). A continuación, tiene lugar la proteólisis y condensación del *core* viral, transformando los IVs en viriones maduros (MVs). Éstos tienen una estructura ovalada en forma de ladrillo y son las primeras formas infectivas del VACV. Los MVs representan una gran parte de los viriones producidos durante el ciclo infeccioso y la mayoría permanecen atrapados dentro de la célula infectada hasta su lisis. Una pequeña proporción de los MVs se mueven a través de microtúbulos desde las factorías virales hasta el trans-golgi, donde adquieren una segunda membrana transformándose en virus intracelulares con envuelta (WVs, «Wrapped Virus»). Los WVs son también transportados a través de la red de microtúbulos hasta la membrana plasmática, fusionándose con esta última y liberándose al medio por lo que se denominan virus extracelulares con envuelta (EVs). Los EVs que permanecen retenidos en la superficie celular inducen la formación de colas de actina que proyectan las partículas virales fuera de la célula, permitiendo la infección célula a célula, mientras que los liberados al medio facilitan la diseminación del virus a larga distancia (Blasco & Moss, 1991b).

## ■ 3. Los poxvirus como vectores vacunales

En el año 1796, Edward Jenner, un médico inglés, inoculó a James Phipps, un niño de ocho años, con el virus Cowpox (agente causal de la viruela bovina) procedente de la llaga de la mano infectada de la ordeñadora Sarah Nelves, tras lo cual el niño quedó protegido frente a la viruela (Jenner, 1798). Este procedimiento recibió el nombre de vacunación y se extendió rápidamente por Europa y el resto del mundo (Miller, 1957). Hacia finales de la década de los 60, se emprendió una campaña de erradicación de la viruela a nivel mundial que culminó en 1977 con el último caso de viruela natural detectado en Somalia (Fenner, 1988). De este modo, en 1980, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró erradicada la viruela, recomendando el cese de la vacunación con el virus vaccinia (OMS, 1980).

Hasta entonces, el virus vaccinia había sido utilizado como modelo para los primeros estudios biológicos y bioquímicos en virología (Smadel & Hoagland, 1942). En este sentido, fue el primer virus animal en ser crecido y titulado en cultivo celular, analizado químicamente (Fenner, 1989) y purificado en cantidades suficientes como para demostrar que contenía ADN pero no ARN (Smadel & Hoagland, 1942). Además, fue el primer virus visualizado bajo un microscopio electrónico (Ruska, 1943).

En los años 80 los poxvirus recobraron nuevamente un gran interés científico cuando, debido al desarrollo de la manipulación genética y a la aplicación de la tecnología del ADN recombinante, los grupos dirigidos por los doctores Bernard Moss y Enzo Paoletti demostraron que el virus vaccinia tenía la capacidad de incorporar en su genoma una gran variedad de genes procedentes de otras especies y que dicha incorporación era estable (Moss, 1991). Esto supuso una revolución en el campo de las vacunas ya que virus vaccinia recombinantes que incorporaran genes de otros patógenos podrían conferir protección frente a los mismos cuando se les inoculase a animales de laboratorio (Moss, 1996; Paoletti, 1996). Por primera vez, un poxvirus era considerado como candidato vacunal contra otros patógenos.

Además de incorporar fácilmente grandes cantidades de material genético exógeno, la experiencia obtenida durante la campaña de erradicación de la viruela sirvió para definir al virus vaccinia como un potente inmunógeno. De este modo, el virus vaccinia constituye un atractivo sistema de expresión capaz de inducir además una fuerte respuesta inmune, tanto celular como humoral, frente al antígeno heterólogo.

El éxito de la utilización de vacunas basadas en poxvirus se demostró en los estudios de campo llevados a cabo con un virus vaccinia recombinante que expresaba la proteína G de la envuelta del virus de la rabia (VRG). El vector se construyó mediante la inserción del gen que codifica para dicha proteína G en el locus de la timidina-quinasa (TK) de la cepa Copenhagen del virus vaccinia (VACV-COP) (Kieny *et al.*, 1984). La eliminación del gen TK permitió una selección bioquímica del recombinante así como la obtención de un fenotipo atenuado del vector. Se observó que la administración de esta vacuna en cápsulas comestibles inducía una respuesta inmunológica contra la rabia en animales capaces de transmitir la enfermedad. Así, este recombinante ha sido utilizado como vacuna antirrábica para zorros en distintas regiones geográficas de Europa y Estados Unidos, obteniendo buenos resultados tanto de seguridad como de eficacia. Del mismo modo, se han generado una gran variedad de poxvirus recombinantes contra enfermedades virales (gripe, encefalitis, enteritis, hepatitis o SIDA), bacterianas (neumonías), parasitarias (malaria o leishmaniasis) y tumorales (melanoma, adenocarcinoma o cáncer de próstata), que se encuentran en fase de experimentación. La frecuencia de aparición de efectos adversos tras la inmunización con el virus vaccinia es de 1 en 50000 (Lane *et al.*, 1970; Fenner *et al.*, 1988; Fenner, 1988). Esta problemática volvió a ser evidente durante la última campaña de vacunación frente a viruela en la población militar de Estados Unidos, en el año 2003, donde aparecieron varios casos de miocarditis aguda en individuos jóvenes sanos (Halsell *et al.*, 2003), mostrando a la comunidad científica la necesidad de nuevas vacunas más seguras pero todavía eficaces.

Son numerosas las estrategias que se han diseñado para aumentar la seguridad de los poxvirus. En este sentido, se han generado varias cepas atenuadas incapaces de replicar en células humanas. Entre dichas estrategias podemos incluir: la generación de virus defectivos

en genes esenciales que no llegan a completar el ciclo infeccioso (Holzer & Falkner, 1997; Ober *et al.*, 2002), los vectores con restricciones en el rango de hospedador, como es el caso de los avipoxvirus atenuados (ALVAC, TROVAC), o el de vectores con mutaciones en genes no esenciales como son las cepas atenuadas del virus vaccinia MVA, NYVAC (Gomez *et al.*, 2008).

A pesar de que las cepas MVA y NYVAC han dado excelentes resultados cuando se han empleado como vectores vacunales frente a múltiples enfermedades, su incapacidad de replicar podría producir una respuesta insuficiente frente al antígeno heterólogo. Como optimización, diversos grupos han apuntado la posibilidad de utilizar virus que sean capaces de replicar durante un número limitado de ciclos en células de mamífero pero que mantengan un fenotipo atenuado (Jacobs *et al.*, 2009).

En nuestro grupo se han generado nuevos mutantes atenuados del VACV mediante infecciones persistentes de la cepa WR en células de eritroleucemia de ratón de Friend. Mediante esta técnica se obtuvieron variantes con una delección grande en el extremo izquierdo del genoma y con repeticiones en tándem en ambos extremos (Paez *et al.*, 1985a). Estos virus mostraron alteraciones en proteínas estructurales importantes para el proceso de morfogénesis, de tal forma que las variantes presentaban fenotipo de placa pequeña y una producción disminuida de virus en comparación con el virus parental (Gómez, 2003). Para el presente trabajo se eligieron los mutantes de pase 65 (M65, mutante 65) y de pase 101 (M101, mutante 101), que presentan potenciales ventajas respecto a las cepas atenuadas MVA y NYVAC, ya que pueden crecer en mayor variedad de líneas celulares y su competencia en replicación les permitiría una expresión del antígeno heterólogo dilatada en el tiempo, lo que podría influir en la magnitud o la calidad de la respuesta inducida por los mismos.

Para evaluar si estos virus competentes en replicación podrían ser óptimos vectores vacunales decidimos caracterizar su capacidad como posible vacuna frente a la leishmaniasis, debido al problema que representa la enfermedad y a la disponibilidad de modelos animales que mimetizan la enfermedad en humanos.

## ■ 4. Leishmaniasis

El término leishmaniasis engloba un grupo de manifestaciones clínicas causadas por protozoos del género *Leishmania* y transmitidas por la picadura de un mosquito. La enfermedad se encuentra presente en 88 países con una prevalencia de 12 millones de personas infectadas. Las primeras descripciones de la enfermedad datan del siglo I d.C. En Perú y Ecuador se han encontrado cerámicas fechadas en los años 400-900 d.C. en las que se representan rostros afectados por leishmaniasis (Lainson & Shaw, 1987). La primera descripción documentada fue realizada en 1756 por el médico escocés Russell, quien describió el *Aleppo evil* (sinónimo de leishmaniasis) en Siria. A finales del siglo XIX, Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Linderberg y Vianna identificaron el parásito causante de las distintas enfermedades en pacientes infectados con las mismas (WHO, 2010). En el año 1903, el parásito fue denominado *Leishmania donovani* por Ross (Choi & Lerner, 2001).



## 4.1. Taxonomía y ciclo vital de *Leishmania* spp

La leishmaniasis está producida por distintas especies de protozoos del género *Leishmania*. La clasificación taxonómica del género *Leishmania* (según Cavalier-Smith, <http://www.taxonomicon.taxonomy.nl>) es la siguiente:

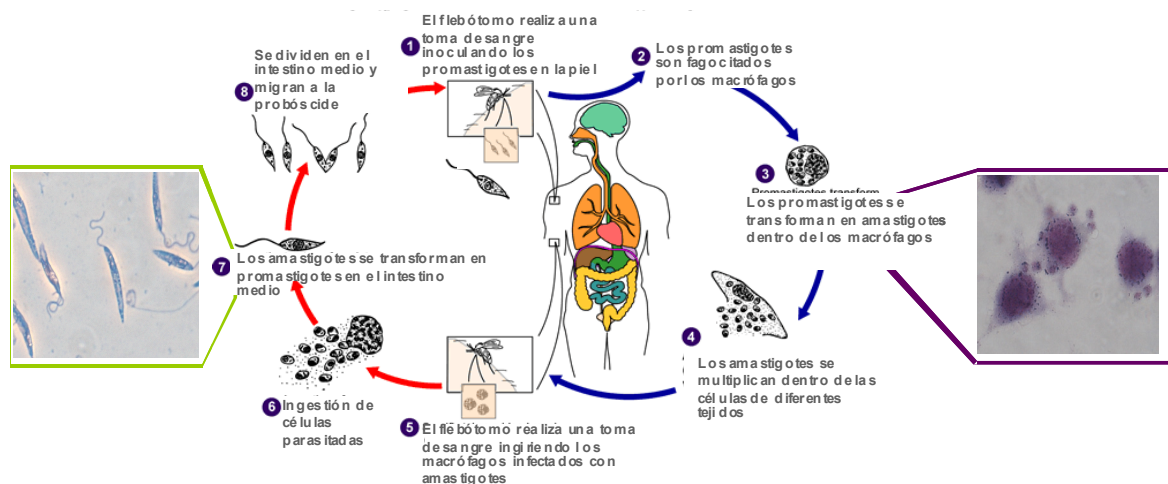
- **Reino Protozoa (Goldfuss, 1818).**
- **Subreino Biciliata (Cavalier-Smith, 2003).**
- **Phylum Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981).**
- **Clase Kinetoplastea (Honigberg, 1963).**
- **Subclase Metakinetoplastina (Moreira, 2004).**
- **Orden Trypanosomatida (Kent, 1880; Hollande, 1952).**
- **Género *Leishmania* (Ross, 1903).**
- **Subgénero *Leishmania* (Ross, 1903).**
- **Subgénero *Viannia* (Lainson y Shaw, 1987).**

Dentro del género *Leishmania* se distinguen dos secciones: Sección *Euleishmania* y Sección *Paraleishmania* (Cupolillo et al., 2000). La Sección *Euleishmania* comprende los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987), según la localización en la que los parásitos se desarrollen en el intestino del vector. El subgénero *Leishmania* incluye a aquellos parásitos que se desarrollan en el intestino medio y anterior del hospedador invertebrado y el subgénero *Viannia* a aquellos que necesitan una fase de desarrollo adicional en el intestino posterior. Los parásitos del subgénero *Leishmania* están presentes en el Nuevo y Viejo mundo, mientras que los del subgénero *Viannia* solo están presentes en el Nuevo Mundo.

- **Subgénero *Leishmania***
  - Complejo *L. donovani*: *L. donovani*, *L. infantum* (*L. chagasi*), *L. archibaldi*.
  - Complejo *L. tropica*: *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. major*, *L. gerbilli*.
  - Complejo *L. mexicana*: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. aristidesi*.
- **Subgénero *Viannia***
  - Complejo *L. braziliensis*: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana*.

La leishmaniasis se transmite por la picadura de un mosquito de la familia *Phlebotomidae* (Viejo mundo) o *Lutzomya* (Nuevo mundo). Únicamente las hembras transmiten la enfermedad, inoculando la forma extracelular infectiva del parásito, llamada **promastigote**, en la sangre de los hospedadores mamíferos cuando pican para obtener la proteína necesaria para producir sus huevos. Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos, donde se transforman en la forma intracelular denominada **amastigote**. Los amastigotes se multiplican en las células infectadas afectando a diferentes tejidos en función de la especie de *Leishmania*. Cuando un mosquito ingiere sangre de un mamífero contaminado, resulta infectado al ingerir los macrófagos que contienen el parásito. Los amastigotes se diferencian en el intestino

medio del vector en la forma extracelular infectiva. Una vez completada la diferenciación, los promastigotes empiezan a desprenderse de la cutícula intestinal y migran a la probóscide del mosquito degradando la válvula estomodeal del mismo (Volf *et al.*, 2004). Al picar a un nuevo hospedador, el flebótomo no puede retener la sangre tras intentar tragarla y la regurgita, inoculando con ella los promastigotes infectivos, denominados metacíclicos, completándose de este modo el ciclo vital, representado en la Figura 5.



**Figura 5. Ciclo vital del parásito. Tinción giemsa de las distintas formas de Leishmania.** Los amastigotes (imagen derecha) son formas redondeadas con unas dimensiones de 3-5 mm × 2-3 mm, con un flagelo rudimentario que no sobresale del soma y que se reproducen por fisión binaria. Los promastigotes (imagen izquierda) son formas móviles y alargadas, con un único flagelo en su polo anterior. Figura adaptada de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>.

## 4.2. Tipos de enfermedad y epidemiología

Existen cuatro manifestaciones clínicas de la enfermedad que varían en función del vector, de la especie de parásito y del estado inmunológico del hospedador:

- **Leishmaniasis visceral (LV):** conocida también como **Kala azar**. Es la forma más severa de la enfermedad, con una tasa de mortalidad alrededor del 75-79% en ausencia de tratamiento (Piscopo & Mallia, 2006). El período de incubación varía de 3 a 8 meses (P.E.C. Manson-Bahr, 1963). Se caracteriza por fiebre irregular, pérdida de peso, esplenomegalia, hepatomegalia y anemia (Figura 6, panel A). En ausencia de tratamiento puede producir caquexia, fallo sistémico, hemorragias, susceptibilidad a contraer infecciones secundarias y muerte. La LV se da en 65 países concentrándose el 90% de los casos mundiales en cinco países: Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán. La LV está producida por las especies *L. chagasi* (América latina), *L. donovani* (Asia y África) y *L. infantum* (centro y sudoeste de Asia y cuenca mediterránea).
- **Leishmaniasis cutánea (LC):** Es una forma más leve de la enfermedad, que en condiciones normales suele remitir incluso sin tratamiento. Una lesión clásica se inicia como una pequeña úlcera en el sitio de inoculación que crecerá lentamente, necesitando al menos una semana para alcanzar su tamaño final, próximo a los 5 cm de diámetro, que suele

remitir de forma espontánea a lo largo de meses o años dejando una cicatriz deprimida y decolorada (Figura 6, panel B). El 90 % de los casos de LC ocurren en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita y Siria. Esta forma de la enfermedad es producida por *L. major* y *L. tropica* en Asia y la región mediterránea. En América las especies responsables son *L. amazonensis* y *L. mexicana*.

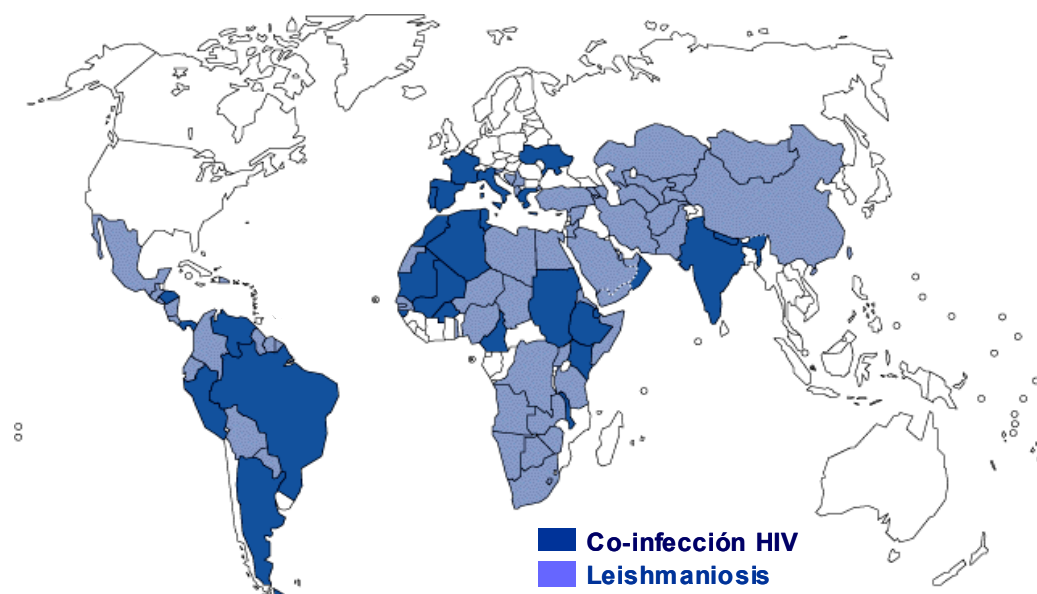
- **Leishmaniasis mucocutánea (LMC):** Conocida también como **espundia**, se caracteriza por la producción de lesiones que pueden conducir a la completa destrucción de las mucosas de la nariz, boca y garganta (Figura 6, panel C). El 90 % de los casos de LMC se dan en Bolivia, Brasil y Perú. La cirugía para reconstruir las desfiguraciones producidas forma parte importante del tratamiento. Esta forma de la enfermedad está provocada por *L. braziliensis* aunque en el Viejo Mundo puede observarse en pacientes inmunodeprimidos infectados con *L. major*, *L. infantum* o *L. tropica*.
- **Leishmaniasis cutánea difusa (LCD):** Se encuentra asociada a un fallo del sistema inmune, y se caracteriza por recidivas después del tratamiento. Esta forma nunca se cura espontáneamente, siendo difícil de tratar debido a la existencia de múltiples lesiones diseminadas, aunque éstas no llegan a ulcerar y se asemejan a las producidas por algunos tipos de lepra (Figura 6, panel D). La LCD es producida por *L. aethiopica* en la cuenca mediterránea, Asia y África, aunque se ha observado este tipo de leishmaniasis provocada por otras cepas, en pacientes inmunodeprimidos coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).



**Figura 6. Formas de la enfermedad.**  
**A.** Leishmaniasis visceral. **B.** Leishmaniasis cutánea. **C.** Leishmaniasis mucocutánea. **D.** Leishmaniasis cutánea difusa.

La enfermedad es endémica en las regiones tropicales y subtropicales en 88 países de Asia, África, Europa y América, 72 de los cuales son países en vías de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 350 millones de personas están expuestas a contraer la enfermedad y se estima que la prevalencia mundial es de 12 millones de personas afectadas. Cada año la incidencia de la forma cutánea de la enfermedad es de 1,5 a 2 millones de nuevos casos y 500.000 de la forma visceral (WHO, 2010). En la última década se ha producido un aumento muy acusado del número de enfermos de leishmaniasis debido, entre otros factores, a los cambios medioambientales que incrementan la exposición del ser humano al vector como, por ejemplo, la construcción de presas, los nuevos sistemas de irrigación, la construcción de carreteras en bosques y la migración de zonas rurales a zonas urbanas (Desjeux, 2004). Otro factor importante es el aumento de los casos de coinfección con el VIH. El SIDA incrementa el riesgo de contraer LV de 100 a 1000 veces en las regiones endémicas. A su vez, los enfermos de leishmaniasis son más susceptibles a la infección por VIH (Alvar *et al.*, 2008; WHO, 2010). En la Figura 7 se muestra la distribución global de los casos descritos de coinfección y la distribución de los casos de leishmaniasis.

Además de la morbilidad y la mortalidad, el impacto económico producido por la leishmaniasis es muy elevado, afectando seriamente a la productividad de los países afectados. Por ello es considerada una de las enfermedades que colabora, entre otros factores, a condenar al Tercer Mundo a ser Tercer Mundo. Además, hay que tener en cuenta el impacto social de la enfermedad, ya que, como sucedía con la lepra, sus lesiones causan rechazo y marginación en multitud de comunidades.



**Figura 7.** Distribución mundial de los casos de leishmaniasis y de coinfección con VIH, 2000 (OMS 2000).

### 4.3. La respuesta inmune frente a *Leishmania*

El uso de modelos murinos ha permitido establecer que el control de la leishmaniasis está asociado con el desarrollo de una respuesta inmune de tipo Th1, en la que se producen citoquinas activadoras de los macrófagos, principalmente  $\text{IFN}\gamma$ , requerido para el control de la replicación del parásito. La susceptibilidad a la enfermedad, por el contrario, se ha asociado al desarrollo de una respuesta inmune de tipo Th2, incapaz de mediar la activación de los macrófagos y que activamente inhibe a las citoquinas de tipo Th1 (Reiner & Locksley, 1995). La activación de los macrófagos, fundamental para el control de la infección, está mediada por citoquinas de tipo Th1 (Reiner & Locksley, 1995), siendo la más importante el  $\text{IFN}\gamma$ . El mecanismo final que confiere resistencia a la infección es la producción de óxido nítrico (ON) por la enzima iNOS en los macrófagos infectados. El  $\text{IFN}\gamma$  es capaz de aumentar la transcripción de la óxido nítrico sintasa (iNOS) y la producción de ON por parte de los macrófagos (Ding *et al.*, 1988). Además del  $\text{IFN}\gamma$ , otras citoquinas están implicadas en la secreción de ON y en el control del parásito. Por ejemplo, la secreción de  $\text{TNF}\alpha$  por los macrófagos infectados está inducida desde la primera semana de infección. Esta citoquina actúa de forma sinérgica con el  $\text{IFN}\gamma$  en la inducción de iNOS y la producción de ON. Por el contrario, las citoquinas de tipo Th2, como las interleuquinas 4, 13 y 10 y el  $\text{TGF-}\beta$  inhiben la activación de los macrófagos mediada por el  $\text{IFN}\gamma$ , lo que conduce al desarrollo de la enfermedad.



Los linfocitos T desempeñan un papel crucial en inducir protección frente a un amplio número de patógenos (Seder *et al.*, 2008). En el caso de la leishmaniasis, múltiples estudios han evidenciado la relevancia de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Darrah *et al.*, 2007; Papadogiannakis *et al.*, 2010; Darrah *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2011; Khamesipour *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a la heterogeneidad de las diferentes vacunas y su distinta capacidad para inducir respuestas inmunológicas, se conocen muy pocos parámetros que correlacionen con protección.

La capacidad de las células T CD4<sup>+</sup> específicas para *Leishmania* de conferir resistencia o de exacerbar la enfermedad al ser transferidas a ratones inmunosuprimidos correlaciona con su capacidad para producir citoquinas de tipo Th1 o Th2, respectivamente (Scott *et al.*, 1988; Holaday *et al.*, 1991). La primera descripción de una línea de células T que confería protección al ser transferida a ratones susceptibles fue realizada en 1988 por Scott y cols. (Scott *et al.*, 1988). Estos autores describieron que los clones que conferían protección y los que exacerbaban la enfermedad diferían en las citoquinas secretadas al ser estimulados con antígenos o mitógenos. Los clones protectores producían IL-2 e IFN $\gamma$  (Th1), mientras que los clones no protectores producían IL-4 e IL-5 (Th2).

De entre los escasos parámetros que correlacionan con protección, más recientemente, Darrah y cols. han descrito que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de perfil Th1 polifuncionales (es decir, capaces de producir varias citoquinas de forma simultánea, en este caso IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) correlacionan con protección en el modelo murino (Darrah *et al.*, 2007) y que la producción de IL-10 por parte de estos linfocitos también puede influenciar la magnitud, calidad y capacidad protectora de las respuestas Th1 inducidas por distintos candidatos vacunales (Darrah *et al.*, 2010).

La presencia de anticuerpos no confiere protección frente a *Leishmania*, sino que se corresponde normalmente con la intensidad de la infección (Mimori *et al.*, 1987; Morsy *et al.*, 1987), reflejando el grado y la duración de la estimulación antigénica determinada por la carga parasitaria (Howard, 1985).

En humanos, la dicotomía Th1/Th2 no es tan evidente como en ratón. Sin embargo, se ha demostrado que existe un predominio de células Th1 en los casos de leishmaniasis cutánea localizada, mientras que los casos de la forma difusa o mucocutánea se han asociado con la presencia de IL-4. Asimismo, la resolución de las lesiones se ha asociado con la producción de IFN $\gamma$ , mientras que en lesiones persistentes se observa la presencia de IL-10 (Rogers *et al.*, 2002). Otro dato que apoya la asociación de resistencia con una respuesta de tipo Th1 es el hecho de que el tratamiento con IFN $\gamma$  induce la rápida resolución de las lesiones en los casos de leishmaniasis cutánea (Kolde *et al.*, 1996). Observaciones recientes en las que se han encontrado linfocitos T CD4<sup>+</sup> polifuncionales en células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) de pacientes que resolvieron lesiones cutáneas, refuerzan el papel de dichos linfocitos en mediar protección frente a leishmania. En ambos casos se observó que dichas células polifuncionales eran capaces de producir mayor cantidad de citoquinas, sobre todo IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  que ya hemos mencionado como cruciales para mediar protección tras la infección con el parásito (Macedo *et al.*, 2012).

En el caso de los perros, principal reservorio de *L. infantum*, la dicotomía Th1/Th2 tampoco es tan patente. No obstante, en perros asintomáticos se ha encontrado una respuesta celular protectora dependiente de la expresión de citoquinas de tipo Th1 (Chamizo *et al.*, 2005).

## 4.4. Tratamiento de la Leishmaniasis

El tratamiento farmacológico de la leishmaniasis se ve limitado al uso de antimoniales pentavalentes como drogas de primera línea y a pentamidina y anfotericina B como drogas secundarias (Nagill & Kaur, 2011). Debido al precio y a la alta duración de los tratamientos (en ocasiones de varias semanas), unido a la cada vez más frecuente aparición de cepas resistentes a los tratamientos de primera línea y a la toxicidad de los tratamientos secundarios, el desarrollo de una vacuna eficaz frente a la leishmaniasis resulta cada vez más necesario.

### 4.4.1. Vacunas

El hecho de que tras una infección natural con *Leishmania spp.* se induzca protección frente a nuevas infecciones, confirma la posibilidad de poder desarrollar una vacuna profiláctica para la leishmaniasis. Una vacuna efectiva debe promover el desarrollo de una respuesta inmune celular de memoria capaz de proliferar rápidamente tras una exposición al parásito dando lugar a una respuesta efectora de tipo Th1.

Se han utilizado distintas aproximaciones para obtener una vacuna efectiva (Melby, 2002; Requena *et al.*, 2004; Nagill & Kaur, 2011; Singh & Sundar, 2012):

- **Parásitos vivos:** La observación de que la LC producida por *L. major* remitía espontáneamente produciendo inmunidad a largo plazo, condujo a la implementación de la primera forma de vacunación con parásitos vivos, denominada **leishmanización**. Esta estrategia de vacunación fue llevada a cabo a principios del siglo XX, principalmente por el ejército (Senekji & Beattie, 1941). Los soldados eran expuestos a las picaduras de los flebótomos, o bien eran inoculados con material proveniente de una lesión. En Asia Central e Israel se han empleado también promastigotes en cultivo. El mayor ensayo de leishmanización fue llevado a cabo durante la guerra de Irán e Irak en los años 80, donde más de 1,3 millones de personas, soldados y civiles, fueron vacunados con promastigotes vivos de *L. major*. Tras la leishmanización, se produce una lesión de 5 a 10 mm. de diámetro que remite espontáneamente después de 4-6 meses. Sin embargo, en el 2-3 % de los casos se desarrollan lesiones mayores que no remiten sin tratamiento. A pesar de ser uno de los métodos más efectivos de vacunación, se hace necesario el desarrollo de nuevas vacunas debido a las dificultades logísticas y a los problemas derivados del uso de cepas virulentas, sobre todo desde la aparición del virus VIH.
- **Parásitos muertos:** Múltiples candidatos de vacunas muertas, también llamadas vacunas de primera generación, se han desarrollado en Brasil, Colombia, Ecuador, Venezuela e Irán para prevenir la LC y en Sudán para prevenir la LV. Los primeros estudios con parásitos muertos se realizaron en los años 1930 y 1940 en Brasil, utilizando la «Vacuna Mayrink», que contenía parásitos resuspendidos en fenol. En Irán se ha empleado la «Vacuna del Instituto Razi» consistente en promastigotes de *L. major* autoclavados junto con el bacilo Calmette-Guérin (BCG), sin que se haya conseguido una reducción en la incidencia de la LC (Sharifi *et al.*, 1998). El empleo de promastigotes de *L. major* autoclavados también se ha ensayado frente a la LV en Sudán sin mostrar evidencias de que dos inmunizaciones produjesen una mayor protección con respecto a la inmunización con BCG (Khalil *et al.*, 2000). Sin embargo Convit y col. Introdujeron en Venezuela la

inmunoterapia con *L. amazonensis* o *L. mexicana* muertos con BCG para el tratamiento de CL, observándose una tasa de cura del 95 % (Cabrera *et al.*, 2000). Promastigotes autoclavados junto con IL-12 han sido probados en monos verdes (*Cercopithecus aethiops*), sin obtenerse protección frente al desafío con *L. amazonensis* a pesar de la inducción de una fuerte respuesta inmune de tipo Th1 (Gicheru *et al.*, 2001). Sin embargo, en otro estudio en el que se emplearon promastigotes de *L. amazonensis* junto con IL-12 y alúmina en monos rhesus (*Macaca mulatta*), sí se obtuvo protección frente al desafío con el parásito (Kenney *et al.*, 1999).

- **Parásitos vivos atenuados:** Se han empleado parásitos avirulentos y/o irradiados con distintos grados de protección. Gracias a los métodos de ingeniería genética, se han desarrollado cepas que únicamente pueden replicar un número limitado de veces, debido a la disrupción de genes esenciales para la supervivencia tales como la dihidrofolato reductasa (Titus *et al.*, 1995; Veras *et al.*, 1999) y las cisteína proteasas a y b (Alexander *et al.*, 1998). El problema de la utilización de parásitos atenuados es la posible reversión a cepas virulentas, como ha ocurrido con un mutante de *L. major* que posee una delección en el gen *lpg2*, implicado en la biosíntesis del lipofosfoglicano. Estos mutantes *lpg2*<sup>-</sup> son capaces de conferir protección frente al desafío con *L. major* (Uzonna *et al.*, 2004b); sin embargo, en algunos casos se ha producido la reversión de forma que los parásitos han sido capaces de replicar en el interior de los macrófagos y producir la enfermedad (Spath *et al.*, 2004).

Para evitar los problemas derivados del uso de parásitos vivos o atenuados, como la reversión a cepas virulentas, principalmente en pacientes con SIDA, y la dificultad en la producción y en la reproducibilidad de los lotes, se han desarrollado nuevas estrategias de vacunación, entre las que podemos distinguir las vacunas subunidad, las vacunas vivas, los componentes salivares del flebótomo y las vacunas de ADN (Coler & Reed, 2005), todas ellas englobadas en lo que se conocen como vacunas de segunda generación.

- **Vacunas subunidad:** Las vacunas subunidad se han centrado fundamentalmente en antígenos proteicos, ya que son fáciles de identificar, aislar y clonar. A pesar de los numerosos esfuerzos científicos en este área, solamente una vacuna subunidad ha llegado a la fase de ensayo clínico en humanos (BB-IND 10116.0037; (Reed & Campos-Neto, 2003; Chakravarty *et al.*, 2011)). Esta vacuna, denominada **Leish-111f®** (Corixa Corp.), consiste en una poliproteína formada por la unión de las proteínas TSA (Antioxidante Tiol Específico) y LmSTI1 (Proteína inducible de estrés 1) de *L. major* y la proteína LelF (Factor de elongación de leishmania) de *L. braziliensis*, administrada con el adyuvante Monofosforil Lípido A en una emulsión estable (MPL-SE).

En Brasil se han comercializado dos vacunas frente a la leishmaniasis canina (Reis *et al.*, 2010), una de ellas, **Leishmune®** (Fort Dodge), está compuesta por una fracción rica en glicoproteínas, conocida como FML, derivada de promastigotes de *L. donovani*. Esta vacuna, además de conferir hasta un 92 % de protección frente a la leishmaniasis visceral canina (da Silva *et al.*, 2000), es un buen agente para la inmunoterapia de la enfermedad (Borja-Cabrera *et al.*, 2004). Recientemente se ha aprobado el uso de una vacuna en Europa, **Canileish®**, que contiene un extracto de proteínas excretadas-secretadas de *L. infantum* (ESP) junto con el adyuvante QA-21, una fracción purificada de saponina obtenida de *Quilaja Saponaria* (Moreno *et al.*, 2012).

- **Vacunas vivas:** Una de las estrategias empleadas para administrar los antígenos recombinantes ha sido el empleo de organismos vivos, como por ejemplo *Salmonella*, BCG o virus (adenovirus, virus vaccinia, etcétera). Un ejemplo es el empleo de *Listeria monocytogenes* que expresa la proteína LACK de *L. major*. La inmunización con tres dosis de  $2 \times 10^9$  bacterias por vía intragástrica confiere un 30-40% de protección frente al desafío con una dosis de  $2,5 \times 10^5$  promastigotes de *L. major* (Soussi *et al.*, 2002). En cuanto al empleo de virus recombinantes, el primer trabajo en el que se describió la utilización del virus vaccinia fue realizado en el año 1993 (McMahon-Pratt *et al.*, 1993), demostrando que un virus recombinante que expresaba la glicoproteína GP46/M-2 inducía protección frente al desafío con *L. amazonensis*. Podría incluirse dentro de este grupo el empleo de células dendríticas como vectores vacunales. Se ha descrito que la inmunización con células de Langerhans pulsadas con extracto crudo de *L. major* confiere protección frente al desafío con el parásito (Flohe *et al.*, 1998). Del mismo modo, con la vacunación de células dendríticas pulsadas con promastigotes de *L. donovani* se obtiene una reducción de 1 a 3 logaritmos en la carga parasitaria (Ahuja *et al.*, 1999). Se ha demostrado que el empleo de células dendríticas estimuladas con los antígenos recombinantes LACK, gp63, PSA, KMP11 y LelF induce protección frente al desafío con *L. major* (reducción en la frecuencia de células infectadas de 3 a 10 veces (Berberich *et al.*, 2003)).
- **Componentes salivares del flebótomo:** Se ha observado que la exposición previa a componentes de la saliva del flebótomo, como la proteína SP15 (Valenzuela *et al.*, 2001), o a picaduras de flebótomos no infectados, resulta en la inducción de resistencia a la infección (Belkaid *et al.*, 1998; Kamhawi *et al.*, 2000). Por lo tanto, la inmunización frente a componentes específicos del vector puede ser una estrategia eficaz para el control de la enfermedad.
- **Vacunas de ADN:** La vacunación con ácidos nucleicos induce una respuesta inmunológica tanto humoral como celular, incluyendo la activación de linfocitos T citotóxicos. Este tipo de vacunación ha sido empleado no solamente con fines profilácticos, sino también terapéuticos, frente a numerosas enfermedades infecciosas (Lowrie *et al.*, 1999; Laddy & Weiner, 2006) y frente a distintos tipos de cáncer (Pecher, 2002; Fioretti *et al.*, 2010). Del mismo modo, se han empleado librerías genómicas de expresión, obteniéndose diferentes grados de protección (Piedrafita *et al.*, 1999; Melby *et al.*, 2000).

A pesar de los resultados prometedores en modelos murinos, las vacunas de ADN no han resultado ser tan efectivas en otros modelos animales (Smooker *et al.*, 2004). No obstante, la inmunización con ADN seguido de una segunda dosis con otro vector, constituye uno de los enfoques más empleados en la actualidad. Este tipo de vacunación se denomina heteróloga o **prime/boost** y será descrito a continuación.

## ■ 5. Protocolo de inmunización heterólogo o prime-boost

Nuestro laboratorio ha sido pionero en el desarrollo de un protocolo de inmunización heterólogo denominado *prime/boost* (inmunización-refuerzo) que permite combinar distintas estrategias vacunales para lograr una potenciación de la respuesta inmunológica que se correlacione con protección (Li *et al.*, 1993; Zavala *et al.*, 2001). Debido a su aceptación general, en este estudio utilizaremos la denominación en inglés de *prime/boost*.



En la actualidad, existe un consenso generalizado de que una primera dosis con ADN recombinante, seguido de una segunda inmunización con un vector viral que exprese el mismo antígeno, genera los mayores niveles de inmunidad específica que, en algunas ocasiones, permite la protección frente a distintas enfermedades infecciosas como SIDA, leishmaniasis o malaria entre otras (Lu, 2009; Hill *et al.*, Radosevic *et al.*, 2009; 2010; Paris *et al.*, 2010). De hecho, en el modelo de malaria, son numerosos los trabajos en los que se emplean múltiples combinaciones de distintos vectores plasmídicos y virales (vaccinia y adenovirus). En todos ellos, la potenciación de la respuesta inmunológica se correlacionó con una inmunidad esterilizante frente a malaria en el 100% de los animales vacunados (Reyes-Sandoval *et al.*, 2007; Vijayan *et al.*, 2012).

Algunas de las estrategias empleadas para combatir la leishmaniasis han sido una primera dosis con ADN seguido de una segunda dosis con proteína o bien un vector atenuado. Por ejemplo, el *booster* con las cisteína proteasas recombinantes CPa y CPb mejora el nivel de protección frente a *L. major* obtenido únicamente con un *priming* con el ADN de las mismas, e induce protección en perros desafiados con *L. infantum* (Rafati *et al.*, 2005). Este no es el caso de la proteína ácida ribosomal P0, donde el *prime/boost* con ADN/proteína no protege frente al desafío con *L. major*, mientras que la inmunización únicamente con ADN desnudo sí confiere protección (Iborra *et al.*, 2003). Otra estrategia es el empleo de vectores atenuados durante el *booster*, como por ejemplo cepas atenuadas de *Salmonella* (Lange *et al.*, 2004) o *adenovirus* (Darrah *et al.*, 2007; Darrah *et al.*, 2010).

El virus vaccinia ha sido también empleado en protocolos de inmunización heteróloga. El *priming* con ADN que expresa la proteína LACK, seguido de un *booster* con un virus vaccinia recombinante que expresa la misma proteína, ha demostrado conferir protección parcial frente a la leishmaniasis cutánea producida por *L. major* en ratones BALB/c (Gonzalo *et al.*, 2002; Lopez-Fuertes *et al.*, 2002; Pérez-Jiménez *et al.*, 2006) así como proteger al 60% de los perros infectados con *L. infantum* (Ramiro *et al.*, 2003; Pérez-Jiménez *et al.*, 2006). Estrategias similares ADN/Poxvirus también han conferido protección con el antígeno TRYP (Tryparedoxina peroxidasa) (Carson *et al.*, 2009).

## ■ 6. El modelo de ratón balb/c

Existen distintos modelos animales para el estudio de la leishmaniasis. Entre las diferentes cepas de ratones se encuentran cepas resistentes a la enfermedad (C57BL/6, C3H/He, B10.D2), cepas de susceptibilidad intermedia (CBA/J) y cepas susceptibles (BALB/c, BALB/b). Una de las ventajas que ofrecen los modelos animales es la capacidad de controlar las cepas de patógenos, la dosis y la ruta de infección. Los ratones BALB/c infectados con *L. major* desarrollan lesiones cutáneas en el sitio de inoculación que no se resuelven, lesiones metastáticas en regiones cutáneas y visceralización, pudiendo morir a causa de la infección (Howard, 1986). La enfermedad en estos animales progresa de forma que mimetiza la leishmaniasis visceral humana. Múltiples son los factores que causan la susceptibilidad en la cepa BALB/c identificadas en estudios comparativos con la cepa resistente C57BL/6. Entre ellas la expansión diferencial de subtipos de células dendríticas a distintos tiempos postinfección (Leon *et al.*, 2007) regulación del receptor de quimioquinas CXCR3 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Barbi *et al.*, 2008) o la expresión de citoquinas por parte de keratinocitos en la epidermis (Ehrchen *et al.*, 2010). Recientemente también se ha descrito que el gen *Fli1* presente en el locus *Imr2* implicado en la reparación de heridas podría ser la diferencia más significativa entre ambos modelos animales (Sakthianandeswaren *et al.*, 2010).

Sin embargo uno de los factores más importantes sigue siendo un defecto en la inducción de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Tras la inmunización con *Leishmania major*, durante la fase inicial de la infección, se produce una secreción masiva de IL-4 y una reducción en la secreción de IL-12 y de IFN $\gamma$ , por lo que la replicación del parásito no se contiene. Esto es debido a que tras la inmunización ocurre una expansión de células CD4<sup>+</sup> Th2 que expresan el receptor V $\alpha$ 8-J $\alpha$ TA72, V $\beta$ 4. Esta expansión clonal ocurre del mismo modo en ratones resistentes; sin embargo, en estos casos esta respuesta desaparece y se desarrolla una respuesta Th1 dominante asociada con la remisión de las lesiones (Reiner *et al.*, 1993; Sacks & Noben-Trauth, 2002). La diana de esta respuesta inicial es el antígeno LACK, que se describe a continuación.

## ■ 7. El antígeno lack

El antígeno LACK es la diana principal de la respuesta inmunológica tras la infección por *Leishmania*. Esta proteína se describió por primera vez en el año 1995 (Mougneau *et al.*, 1995b), al tratar de descubrir cuál era el antígeno reconocido por un clon de células T capaz de conferir protección frente a la infección con *L. major*. Mediante el empleo de una librería de expresión, se determinó que este clon era activado por una proteína de 36 KDa que presentaba una alta homología con los receptores intracelulares de la proteína kinasa C, también conocidos como RACKs, por lo que se le asignó el nombre LACK (*Leishmania homolog of receptors for activated C kinase*). La proteína LACK es una proteína citoplasmática, unida a complejos multiproteicos. Mediante inmunofluorescencia se ha determinado su localización en dos zonas limitadas de aproximadamente 0,4  $\mu$ m de diámetro, cercanas al kinetoplasto. Se expresa tanto en la forma de promastigote como en la forma de amastigote, siendo los niveles de expresión constantes a lo largo de todo el ciclo vital del parásito (Gonzalez-Aseguinolaza *et al.*, 1999).

La proteína LACK está codificada por dos genes unidos en tándem. Se requiere al menos una copia para la viabilidad del parásito, y al menos dos copias para mantener la virulencia en el hospedador vertebrado (Kelly *et al.*, 2003). Se trata de una proteína altamente conservada entre las diferentes especies de *Leishmania*: la proteína LACK de *L. infantum* presenta un 99 % y un 100 % de homología con *L. major* y *L. chagasi*, respectivamente. Esta identidad no se limita únicamente al género *Leishmania*; existe un alto grado de homología con los análogos de RACK de *Trypanosoma brucei* (83 %) y de mamíferos (72 %) (Gonzalez-Aseguinolaza *et al.*, 1999).

La expresión de la proteína LACK en el timo de ratones transgénicos para la misma les confería resistencia ante la infección experimental con *L. major*, demostrando así que el desarrollo de una respuesta inmunológica frente al antígeno LACK es una de las principales causas de la susceptibilidad (Julia *et al.*, 1996). Otras aproximaciones han demostrado que esta proteína constituye la diana preferencial de la respuesta inmunológica inicial frente al parásito, siendo la responsable de la expansión de las células V $\beta$ 4V $\alpha$ 8, que reconocen un epítipo dominante comprendido entre los aminoácidos 157 y 173 (FSPSLEHPIVVSGSWDN, LACK<sub>157-173</sub>) desarrollando una respuesta tipo Th2. Del mismo modo, la modulación de la respuesta mediante la administración de IL-12 o IFN $\gamma$  indica que las células V $\beta$ 4V $\alpha$ 8 no son completamente maduras, de forma que pueden ser redirigidas hacia Th1 (Afonso *et al.*, 1994). El antígeno LACK se ha convertido en uno de los más utilizados a la hora de desarrollar vacunas frente a la leishmaniasis. Diferentes trabajos han puesto de manifiesto la capacidad de

esta proteína, junto con adyuvantes, de conferir protección frente a la leishmaniasis. Mougneau y cols. demostraron que la inmunización con una porción de 24 KDa de la proteína (LACKp24) no induce protección, mientras que la inmunización de la misma junto con IL-12 recombinante protegía parcialmente frente al desafío con *L. Major* (Mougneau *et al.*, 1995b). Gurunathan y cols. demostraron que la inmunización con ADN-LACKp24 era similar a la obtenida con la proteína recombinante junto con IL-12 (Gurunathan *et al.*, 1997). A pesar de los buenos resultados obtenidos frente a la leishmaniasis cutánea producida por *L. major*, no se ha conseguido protección frente a otras especies como *L. amazonensis* (Okuno *et al.*, 2002; Coelho *et al.*, 2003), *L. donovani* (Melby *et al.*, 2001) o *L. mexicana* (Dumonteil *et al.*, 2000). En el caso de la infección producida por *L. infantum* en perros, dos dosis de ADN-LACK (proteína completa) no confieren protección, pero ésta puede alcanzarse mediante la inmunización heteróloga consistente en una primera dosis de ADN-LACK seguido de una dosis con un virus vaccinia recombinante que exprese el mismo antígeno (Pérez-Jiménez *et al.*, 2006; Ramiro *et al.*, 2003). En un estudio en el que se comparan diferentes candidatos vacunales en forma de ADN frente a *L. major*, se ha demostrado que el más prometedor es LACK, en su forma de 24 KDa; sin embargo, en ninguno de los casos se obtuvo protección completa tras el desafío (Ahmed *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta lo descrito con anterioridad y los resultados esperanzadores obtenidos con el empleo de la proteína LACK decidimos utilizarla en el presente trabajo como antígeno en protocolos de inmunización heteróloga con el objetivo de desarrollar una vacuna eficaz frente a la leishmaniasis.



# Objetivos

Objetivos

Objetivos

Objetivos

Objetivos

# 2





Los poxvirus han demostrado un importante potencial como vectores vacunales frente a múltiples enfermedades prevalentes. Originariamente, se utilizaron cepas de virus capaces de replicar en humanos pero dichas cepas han sido desplazadas por otras que han perdido dicha capacidad, con el objetivo de aumentar su seguridad. Sin embargo con el empleo de este tipo de cepas atenuadas, se ha limitado el tiempo de expresión del antígeno heterólogo. Por lo tanto, el presente trabajo nace de la necesidad de identificar cepas de virus con un fenotipo intermedio, que mantengan cierta capacidad replicativa, y con ella una expresión del antígeno dilatada en el tiempo, pero que a su vez mantengan un fenotipo atenuado.

Para este trabajo se seleccionaron dos mutantes de la cepa WR generados tras infecciones persistentes en células de eritroleucemia de ratón de Friend que podrían encajar con las características requeridas: los mutantes M65 y M101.

Para evaluar si estos virus podrían ser óptimos vectores vacunales decidimos caracterizar en profundidad su capacidad replicativa, su grado de atenuación y sus propiedades inmunológicas como posible vacuna frente a la leishmaniasis. Para ello, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Evaluar la capacidad replicativa de los virus M65 y M101 en distintas líneas celulares y en ratones BALB/c.
2. Estudiar el grado de atenuación de los virus M65 y M101 en el modelo de ratón BALB/c.
3. Secuenciar y analizar los genomas de los virus mutantes M65 y M101 para estudiar su fenotipo a partir de su genotipo.
4. Evaluar la protección obtenida frente a un desafío con distintas cepas de leishmania con los virus M65 y M101 recombinantes para el antígeno LACK, en protocolos de inmunización heterólogos prime/boost (ADN/poxvirus) en el modelo murino de leishmaniasis cutánea.
5. Identificar y caracterizar las poblaciones celulares de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> inducidas por el protocolo heterólogo de vacunación ADN/poxvirus con los virus M65 y M101 recombinantes para el antígeno LACK, así como el impacto en dichas poblaciones de la infección experimental con *L. major* en animales vacunados.





# Materiales y métodos

Materiales y métodos

Materiales y métodos

Materiales y métodos

Materiales y métodos

Materiales y métodos

# 3





## ■ 1. Materiales Biológicos

### 1.1. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en este trabajo fueron las siguientes:

- **A20:** Células de un linfoma de células B derivadas de un reticulosarcoma espontáneo desarrollado en un ratón BALB/cAnN.
- **BSC40:** Células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*).
- **BHK21:** Línea fibroblastoide de riñón de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*).
- **CEF (Chicken embryo fibroblasts):** Cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo (*Gallus gallus*) obtenidos a partir de embriones de 9 a 10 días de incubación.
- **DF1:** Fibroblastos embrionarios de pollo (*Gallus gallus*) inmortalizados.
- **HeLa:** Línea celular procedente de carcinoma epitelial humano de cuello uterino.
- **3T3:** Línea fibroblastoide de ratón (*Mus musculus*).

### 1.2. Medios de cultivo

Las líneas celulares BHK21, DF1, 3T3 y CEF se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) ((Dulbecco & Freeman, 1959); Gibco BRL), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal de ternera (FCS; Sigma), penicilina (100 U/ml; Sigma), estreptomicina (100 µg/ml; Sigma), fungizona (0,5 U/ml; Gibco), glutamina (2 mM; Merck) y aminoácidos no esenciales (Sigma) (DMEM completo). La línea celular BSC40 se cultivó en el mismo medio pero suplementado con 10% de suero de ternera recién nacida (NCS; Sigma).

Para los cultivos primarios de linfocitos de bazo y la línea celular A20 se empleó el medio RPMI-1640 (Gibco BRL), suplementado con 10% de FCS, penicilina, estreptomicina, β-mercaptoetanol (10 µM; Sigma), HEPES pH 7.4 (10 mM) y L-glutamina (2 mM).

Para la transfección transitoria de cultivos celulares se utilizó OPTIMEM (Gibco).

Para las infecciones, se empleó DMEM completo durante la hora de adsorción, tras la cual se retiró el inóculo y se añadió DMEM completo suplementado con 2% de suero.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en un incubador a una temperatura de 37°C (salvo las DF1 que se mantuvieron a 39°C) y un porcentaje de CO<sub>2</sub> del 5%.

### 1.3. Obtención de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF)

Los cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo se obtuvieron a partir de embriones de 9 a 10 días de incubación, suministrados por Intervet (Salamanca). La cáscara se lavó con etanol y se colocó sobre un soporte con el polo más ancho hacia arriba. Con pinzas estériles se abrió el cascarón y se rompió la membrana corioalantoidea para penetrar en la cavidad amniótica. El embrión extraído del huevo se decapitó y evisceró. El tejido resultante se lavó tres veces con tampón fosfato salino (PBS) precalentado a 37°C y se troceó mecánicamente con ayuda de unas tijeras. La papilla resultante se digirió con tripsina (10 ml de tripsina al 0.25 % en PBS/embrión; Sigma) a 37°C durante 1 hora, tras lo cual se filtró a través de una rejilla metálica, se le añadió un volumen igual de medio DMEM completo y se centrifugó a 1500 rpm durante 25 min. El precipitado de células resultante se resuspendió en un volumen adecuado de medio DMEM suplementado con 5 % FCS, penicilina, estreptomomicina y fungizona.

### 1.4. Bacterias

La cepa de *Escherichia coli* utilizada para las transformaciones, obtención de clones y crecimiento de los plásmidos fue DH5 $\alpha$ . Para la expresión y purificación de la proteína LACK-His se utilizó la cepa BL21 (plys). Las bacterias se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) (1 % bacto-triptona, 1 % NaCl, 0.5 % extracto de levadura) (Sambrook *et al.*, 1989), suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina (Boehringer Mannheim).

### 1.5. Leishmania

En el presente estudio se utilizaron dos especies de *Leishmania*:

***Leishmania major*:** Cepa WHOM/IR-173, cedida por el Dr. Nicolas Glainchenhaus del Centre National de la Recherche Scientifique, Francia (Mougneau *et al.*, 1995a).

***Leishmania amazonensis*:** Cepa LTB0016, cedida por la Dr. Diane McMahon-Pratt, del Departamento de Epidemiología y Salud Pública de la Universidad de Medicina de Yale, New Haven, Estados Unidos.

Para el cultivo de los promastigotes de *Leishmania major* se empleó el medio de insecto de Schneider's (Sigma-Aldrich) suplementado con 20 % FCS, kanamicina (100  $\mu$ g/ml; Sigma), penicilina (10 U/ml), estreptomomicina (10  $\mu$ g/ml) y glutamina (2 mM). Para el cultivo de los promastigotes de *Leishmania amazonensis* se empleó el medio de insecto de Schneider's (Sigma-Aldrich) suplementado con 20 % FCS, Gentamicina (17.5  $\mu$ g/ml) y glutamina (2 mM).

### 1.6. Virus

Los virus utilizados en el presente trabajo fueron la cepa salvaje WR (*Western Reserve*) cedida por el Dr. Rostom Bablanian de la Universidad Estatal de Nueva York, la cepa atenuada MVA (*Modified vaccinia Ankara*) cedida por el Dr. Gerd Sutter del Instituto de Virología Molecular de Munich (Alemania) y las cepas mutantes en estudio M65 y M101 del virus Vaccinia (VACV). Los virus recombinantes empleados en este estudio se describen en la siguiente tabla:

Virus recombinante	Proteína recombinante	Promotor <sup>a</sup>	Locus <sup>b</sup>
WR-Luc	Luciferasa ( <i>Photinus Pyralis</i> )	p <sub>7.5</sub>	TK
M65-Luc	Luciferasa ( <i>Photinus Pyralis</i> )	p <sub>7.5</sub>	TK
M101-Luc	Luciferasa ( <i>Photinus Pyralis</i> )	p <sub>7.5</sub>	TK
MVA-Luc	Luciferasa ( <i>Photinus Pyralis</i> )	p <sub>7.5</sub>	TK
M65-LACK	LACK ( <i>Leishmania infantum</i> )	p <sub>E/L</sub>	HA
M101-LACK	LACK ( <i>Leishmania infantum</i> )	p <sub>E/L</sub>	HA
MVA-LACK	LACK ( <i>Leishmania infantum</i> )	p <sub>E/L</sub>	HA

**Tabla 1. Virus Vaccinia utilizados.** <sup>a</sup> Promotor bajo el control del cual se expresa la proteína recombinante. p<sub>7.5</sub>: Promotor viral temprano/tardío; p<sub>E/L</sub>: promotor viral sintético temprano/tardío. <sup>b</sup> Locus de inserción del gen recombinante. TK: Timidina quinasa; HA: Hemaglutinina.

## 1.7. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este estudio se describen a continuación:

- **pCI-NEO:** Vector comercial (Promega) de expresión eucariota que contiene el promotor/potenciador del citomegalovirus humano, un intrón quimérico y la señal de poliadenilación del virus SV40. Contiene además el promotor de la polimerasa T7. Como marcadores de selección incluye los genes de resistencia a ampicilina y a neomicina.
- **pCI-NEO-LACK:** Plásmido obtenido al insertar el gen de la proteína LACK de *L. infantum* en el plásmido comercial pCI-NEO. Este plásmido fue generado previamente a la realización de el presente estudio.
- **pRSETB-LACK-His:** Vector de expresión en procariotas derivado del plásmido comercial pRSET B (Invitrogen) que contiene el gen de la proteína LACK de *L. Infantum* bajo el control del promotor T7 y como proteína de fusión con un dominio de seis histidinas fusionadas en el extremo amino terminal, que permite la purificación por cromatografía de afinidad en columnas de níquel. Como marcador de selección contiene el gen de resistencia a ampicilina. Este plásmido fue generado y cedido por la Dra. Gloria González-Aseguinolaza (Gonzalez-Aseguinolaza *et al.*, 1999).
- **pSC11-Luc:** vector utilizado para la inserción del gen de la luciferasa en el genoma de VACV mediante recombinación homóloga en el locus de la Timidina quinasa (TK) (Rodriguez *et al.*, 1988). La expresión del gen heterólogo se encuentra bajo el control del promotor viral sintético temprano/tardío (p<sub>7.5</sub>) y el gen marcador para la selección de virus recombinantes es el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa que se encuentra bajo el control transcripcional del promotor viral tardío p<sub>11</sub>. Como gen de selección contiene el gen de resistencia a ampicilina.

## 2. Reactivos

### 2.1. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este estudio se resumen en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Características	Procedencia
<b>Anticuerpos primarios</b>		
<b>Conejo <math>\alpha</math> LACK</b>	Anticuerpo policlonal generado en conejo que reconoce específicamente la proteína LACK de <i>L. infantum</i>	Centro Nacional de Biotecnología, Madrid
<b>Conejo <math>\alpha</math> WR</b>	Anticuerpo policlonal generado en conejo contra las proteínas de la cepa WR del virus Vaccinia	<b>(Demkowicz <i>et al.</i>, 1992)</b>
<b>Rata <math>\alpha</math> IFN<math>\gamma</math> de ratón</b>	Anticuerpo monoclonal de isotipo IgG1 que reconoce el IFN $\gamma$ murino; clon R4-6A2	BD Pharmingen, San Diego, CA
<b>Conejo <math>\alpha</math> CD16/CD32 de ratón</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente al receptor Fc $\gamma$ III/II de ratón; clon 2.4G2	BD Pharmingen, San Diego, CA
<b>Anticuerpos conjugados (Western Blot)</b>		
<b>Cabra <math>\alpha</math> IgG de conejo - HRP</b>	Anticuerpo policlonal generado en cabra conjugado con peroxidasa que reconoce IgG de conejo.	Sigma
<b>Anticuerpos conjugados (ELISPOT)</b>		
<b>Rata <math>\alpha</math> IFN<math>\gamma</math> de ratón-Biotina</b>	Anticuerpo monoclonal de isotipo IgG1 que reconoce el IFN $\gamma$ murino conjugado con biotina; clon XMG1.2	BD Pharmingen, San Diego, CA
<b>Anticuerpos conjugados (FACS)</b>		
<b>Rata <math>\alpha</math> CD3a de ratón - FITC</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente al antígeno CD3 (gd TCR-positive T-T hybridoma D1) de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína; clon 17A2	BD Pharmingen, San Diego, CA
<b>Rata <math>\alpha</math> CD4-Alexa700</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente al antígeno CD4 (L3T4) de ratón conjugado con Alexa700; clon RM4-5	BD Pharmingen, San Diego, CA
<b>Rata <math>\alpha</math> CD8a-PerCP</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente al antígeno CD8a (Ly-2 o Lyt-2) de ratón conjugado con ficoeritrina y peridina-clorofil-proteína; clon 53-6.7	BD Pharmingen, San Diego, CA
<b>Rata <math>\alpha</math> CD8-HorizonV500</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente al antígeno CD8a (Ly-2 o Lyt-2) de ratón conjugado con HorizonV500; clon: 53-6.7	BD Pharmingen, San Diego, CA

Anticuerpo	Características	Procedencia
<b>Rata <math>\alpha</math> CD44-SPRD</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente un epítipo próximo al dominio de unión de Hialuronato de CD44 de ratón conjugado con «spectral red» o SPRD	Beckton Coultek
<b>Rata <math>\alpha</math> CD62-FITC</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente al antígeno CD62L (L-Selectina; LECAM-1, Ly-22) de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína; clon: MEL-14	eBioscience
<b>Rata <math>\alpha</math> IFN<math>\gamma</math>-APC</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente a la proteína recombinante IFN $\gamma$ de ratón conjugado con alofocianina; clon: XMG1.2	BD Pharmingen, San Diego, CA
<b>Rata <math>\alpha</math> IFN<math>\gamma</math>-PECy7</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente a la proteína recombinante IFN $\gamma$ de ratón conjugado con el tándem ficoeritrina-cianina 7; clon: XMG1.2	BD Pharmingen, San Diego, CA
<b>Rata <math>\alpha</math> IFN<math>\gamma</math>-PerCP-PECy5.5</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente a la proteína recombinante IFN $\gamma$ de ratón conjugado con el tándem ficoeritrina-cianina 5.5; clon: XMG1.2	eBioscience
<b>Rata <math>\alpha</math> IL2-APC</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente a la proteína recombinante IL-2 de ratón conjugado con alofocianina; clon: JES6-5H4	BD Pharmingen, San Diego, CA
<b>Rata <math>\alpha</math> IL2-PE</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente a la proteína recombinante IL-2 de ratón conjugado con ficoeritrina; clon: JES6-5H4	BD Pharmingen, San Diego, CA
<b>Rata <math>\alpha</math> TNF<math>\alpha</math>-PECy7</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente a la proteína recombinante TNF $\alpha$ de ratón conjugado con ficoeritrina-cianina 7; clon: MP6-XT22	BD Pharmingen, San Diego, CA
<b>Rata <math>\alpha</math> TNF<math>\alpha</math> de ratón - PE</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente al TNF $\alpha$ de ratón conjugado con ficoeritrina; clon: MP6-XT22	BD Pharmingen, San Diego, CA
<b>Rata <math>\alpha</math> CD107a-Alexa488</b>	Anticuerpo monoclonal generado frente al antígeno CD107a (LAMP-1) de ratón conjugado con Alexa488; clon: 1D4B	eBioscience

**Tabla 2.** Resumen de los anticuerpos utilizados para las distintas técnicas realizadas.

## 2.2. Antígeno soluble de *Leishmania* (ASL)

El antígeno soluble de *Leishmania* se preparó a partir de cultivos de promastigotes de *L. major* o *L. Amazonensis* en fase estacionaria de crecimiento a una densidad aproximada de  $2 \times 10^8$  promastigotes/ml. Los cultivos se recogieron y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. a 4°C. Tras varios lavados con PBS, el precipitado se resuspendió en 5 ml de PBS y se sometió a cinco ciclos de congelación/descongelación. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. a 4°C y se recogió el sobrenadante en alícuotas de 0.5 ml. La concentración de proteína se determinó utilizando el método BCA (ácido bicinonínico) de Pierce.

## 2.3. Péptido Lack

El péptido **FSPSLEHPIVVSGSWDN** está contenido en la proteína LACK de *L. major* (aminoácidos 157-173; LACK<sub>157-173</sub>). Fue generado por el servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología. Este péptido de 17 aminoácidos se encuentra también en la proteína LACK de *L. infantum* y de la análoga *L. chagasi* (Gonzalez-Aseguinolaza *et al.*, 1999).

## 2.4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio aparecen detallados en la siguiente tabla:

Oligonucleotido	Secuencia (5' ® 3')	Molde
HA1	GTCACGTGTTACCACGCA	HA WR MVA
HA2	GATCCGCATCATCGGTGG	HA WR
HAMVA	TGACACGATTACCAATAC	HA MVA
TK1	AACGGCGGACATATTCAG	TK WR MVA
TK2	ATGAGTCGATGTAACACT	TK WR MVA
MYC A	GGCGAATGGGTGAGTAACACG	<i>Mycoplasma</i>
MYC B	CGGATAACGCTTGCGACCTATG	<i>Mycoplasma</i>

**Tabla 3.** Oligonucleótidos.

## 2.5. Tampones

- **PBS:** NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM.
- **Tampón de carga (Laemmli):** Tris-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2 %, β-mercaptoetanol 5 %, glicerol 10 % y azul de bromofenol 0.012 %.
- **Tampón de electroforesis para SDS-PAGE (Tris-glicina SDS):** Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1 %.
- **Tampón citrato-fosfato:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M y citrato sódico 0.1 M.
- **Tampón carbonato (0.1 M pH 9.6):** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M y NaHCO<sub>3</sub> 0.2 M.
- **Tampón de Proteinasa K:** Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM y SDS 1 %.
- **TBE:** Tris-Borato pH 8.3 90 mM y EDTA 2 mM.
- **TBS:** 0.5M Tris Base, 9 % NaCl, pH 8.4.
- **Tampón de carga de ADN:** Xylen-cyanol 0.25 %, glicerol 30 % y azul de bromofenol 0.25 %.



## ■ 3. Metodología

### 3.1. Manipulación del ADN

Para la preparación y transformación de células competentes, la purificación de plásmidos, el aislamiento de fragmentos de ADN y las clonaciones, se ha seguido la metodología descrita en el libro *Molecular Cloning: a laboratory manual* (Sambrook et al., 1989).

#### 3.1.1. Transfección transitoria de cultivos celulares

Para la transfección transitoria de cultivos celulares se utilizó lipofectamina (Invitrogen) en monocapas subconfluentes (80 %) de células. Tanto el ADN plasmídico como la lipofectamina se diluyeron en medio OPTIMEM (10 µg ADN/3x10<sup>6</sup> células; 3 µl lipofectamina/µg ADN). La solución de lipofectamina se mezcló con la solución que contiene el ADN, y se incubó durante 20 min. a temperatura ambiente, tras lo cual se añadió a las células. Después de 5-8 horas, las células se lavaron y se añadió medio DMEM suplementado con 2 % de suero. Las células se recogieron en tampón de carga a distintos tiempos post-transfección según el experimento. Para la nucleofección de células A20 -presentadoras de antígeno utilizadas para la re-estimulación de esplenocitos- se utilizó el kit comercial Amaxa<sup>TM</sup> SF Cell Line 4D-Nucleofector<sup>TM</sup> X Kit L (LONZA, Cologne, Germany) y el nucleofector 4D (LONZA, Cologne, Germany). 2x10<sup>6</sup> células A20 se resuspendieron en 100 µl de la mezcla de nucleofección. Posteriormente, se añadieron 6 µg de ADN plasmídico y se transfirió el volumen a la cubeta de nucleofección. Se nucleofectaron utilizando el programa de linfocitos B murinos y el pulso DI 100. Tras la nucleofección las células se sembraron en pocillos de MW12 en RMPI suplementado con 10 % (v/v) FCS hasta su uso.

#### 3.1.2. Análisis por PCR

Las reacciones de PCR para el análisis de la pureza de los virus recombinantes se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl por reacción y contenían 200 ng de molde de ADN viral, 100 ng de cada oligo, 1 unidad de Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 0.2 mM de cada deoxinucleótido en el tampón suministrado por la casa comercial (Invitrogen), suplementado con 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. Se empleó un termociclador PTC-100<sup>TM</sup> Programmable Thermal Controller (MJ Research, INC.). El programa de PCR utilizado para amplificar la región contenida entre las secuencias flanqueantes de la HA fue el siguiente: Una etapa de desnaturalización inicial de 5 min. a 95°C seguida de 35 ciclos de desnaturalización (1:30 min. a 95°C), anillamiento (45 segundos a 55°C) y extensión (1:30 min. a 72°C); seguido de una extensión final de 7 min. a 72°C. El programa de PCR utilizado para amplificar la región contenida entre las secuencias flanqueantes de la TK fue el siguiente: Una etapa de desnaturalización inicial de 3 min. a 95°C seguida de 35 ciclos de desnaturalización (1:30 min. a 95°C), anillamiento (1 min. a 55°C) y extensión (1:30 min. a 72°C); seguido de una extensión final de 7 min. a 72°C. El programa de PCR utilizado para la detección de micoplasmas fue el siguiente: Una etapa de desnaturalización inicial de 3 min. a 95°C seguida de 35 ciclos de desnaturalización (2 min. a 95°C), anillamiento (30 seg. a 60°C) y extensión (1:30 min. a 72°C); seguido de una extensión final de 7 min. a 72°C.

### 3.1.3. Purificación de ácidos nucleicos

#### ***Purificación de fragmentos de ADN.***

El aislamiento y purificación de fragmentos de ADN se realizó a partir de geles de agarosa utilizando el Kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen).

#### ***Purificación de ADN plasmídico.***

Para el análisis de transformantes se realizó la purificación de pequeñas cantidades de ADN de un cultivo de bacterias crecido en un volumen de 3 ml de LB suplementado con ampicilina, siguiendo el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y cols. (Sambrook *et al.*, 1989).

Para la producción de grandes cantidades de ADN plasmídico se utilizaron las columnas QIAGEN-tip 500 (QIAGEN) siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. Estas preparaciones de plásmidos se emplearon para secuenciación y transfección de células de mamífero. Para la purificación de ADN destinado a las inmunizaciones de los animales se utilizó el Mega-Prep Endo-Free Kit (QIAGEN) resuspendiéndose el ADN en agua bidestilada libre de pirógenos.

#### ***Purificación de ADN viral.***

El ADN viral destinado al análisis por PCR de la pureza de los virus recombinantes se obtuvo a partir de monocapas de células infectadas. Cuando se observó efecto citopático, la monocapa se recogió y, tras dos lavados con PBS centrifugando a baja velocidad, el precipitado se conservó a -20°C hasta su utilización. Para la extracción del ADN, se resuspendieron las células en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, y se añadió Proteinasa K (200 µg/ml, Roche) en su tampón correspondiente (50 mM Tris-HCl pH=8, 100 mM EDTA pH=8, 100 mM NaCl, 1 % SDS). Se incubó a 55°C durante 1-2 horas, tras lo cual se añadió RNasa (40 µg/ml, Roche) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Una vez finalizada la incubación, se añadió NaCl saturado y se mezcló cuidadosamente. A continuación se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante y se mezcló con isopropanol (proporción 1:0.7). La mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min., el precipitado se lavó con etanol al 75 % y de nuevo se centrifugó 10 min. Finalmente, el ADN precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de agua estéril durante toda la noche a 4°C.

El ADN viral destinado a la secuenciación de los genomas se obtuvo a partir de preparaciones de virus purificado por gradiente. Brevemente,  $5 \times 10^8$  ufp de virus se resuspendieron en 1 ml de buffer que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>. La suspensión se incubó con 20 unidades de ADNasa libre de ARNasa (Roche Applied Science, USA) 30 min. a 37°C. Tras el tratamiento con ADNasa se añadió sarcosyl a una concentración final de 0.5 %. Posteriormente se incubó la muestra 1 hora a 37°C con Proteinasa K (Quiagen) a una concentración final de 200 µg/ml. Se añadió un volumen de fenol equilibrado y se mezcló la muestra por inversión, centrifugándose posteriormente a 13000 rpm durante 5 min. Se recogió el sobrenadante y se le añadieron dos volúmenes de cloroformo/alcohol Isoamílico (1:1) y la muestra se centrifugó 12000 rpm durante 5 min. Posteriormente se resuspendió la muestra en dos volúmenes de etanol al 100 % y se añadió cloruro sódico a una concentración final de 0.2 M. Se dejó precipitar el ADN incubándolo durante la noche a -20°C. Tras la incubación la muestra se centrifugó 10000 rpm durante 5 min. El precipitado se lavó con etanol al 75 %, se centrifugó de nuevo y se dejó secar antes de resuspenderlo en 200 µl de H<sub>2</sub>O. La concentración de ADN se midió utilizando un NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

### ***Secuenciación masiva y análisis de las secuencias.***

La preparación de la biblioteca se realizó de acuerdo a las recomendaciones de Illumina. Brevemente, 5 µg de ADN genómico se fragmentaron con el objetivo de obtener secuencias de un tamaño máximo de 250 pares de bases. Tras finalizar la reparación de los extremos y la poliadenilación de las colas; adaptadores internos se ligaron al ADN. La selección tras la ligación se realizó en geles de agarosa al 2 %, recuperándose fragmentos de alrededor de 250 pares de bases. El ADN se recuperó del gel usando el método de extracción comercial QIAquick (QIAGEN), y el ADN se amplificó empleando 12 ciclos de PCR usando el estándar de PE Illumina. La calidad de las bibliotecas se confirmó con el Agilent 2100 Bioanalyzer. Las bibliotecas cuantificadas fueron cargadas como grupos en un carril de una celda de flujo illumina y secuenciadas en el Analizador de Illumina Genoma Ix con un programa de 36 ciclos.

El alineamiento de los fragmentos de secuencias con el genoma de vaccinia se realizó utilizando BWA (Li & Durbin, 2009). Los ficheros de alineamientos en formato SAM se transformaron a formato BAM, y se indexaron con SAMtools (Li *et al.*, 2009). Para detectar de forma estadística polimorfismos de simple nucleótido (SNPs), así como inserciones o deleciones (INDELs), se utilizó GenomeAnalysisToolKit (GATK) (McKenna *et al.*, 2010). La opción IndelRealigner se aplicó para refinar alineamientos.

## **3.2. Manipulación de virus**

### **3.2.1. Generación de los virus vaccinia recombinantes M65-Luc y M101-Luc**

Para la generación de los virus recombinantes se utilizó la metodología descrita en *Current protocols in Molecular Biology* (actualización de Earl y Moss, 1991). Para la construcción de recombinantes basados en los virus mutantes M65 y M101 derivados de la estirpe salvaje WR se infectaron monocapas subconfluentes de células BSC40 a una multiplicidad de infección de 0.05 ufp/célula. Tras una hora de adsorción, se retiró el inóculo y se llevó a cabo la transfección del plásmido de inserción correspondiente en forma de complejos de ADN-liposomas formados durante 20 min. a temperatura ambiente con 10 µg de ADN y 30 µl de lipofectamina en medio OPTIMEM (Gibco). La mezcla se retiró 5 horas después de la transfección añadiéndose medio DMEM completo suplementado con 2 % de NCS. 48 horas después de la infección-transfección se recogieron las células y se lisaron mediante tres ciclos sucesivos de congelación/descongelación y posterior sonicación. Con los extractos obtenidos se infectaron nuevamente monocapas de células BSC40 a diferentes diluciones y tras la adsorción se añadieron 2 ml de una mezcla 1:1 de agar (1.9 %) y DMEM 2X, suplementado con 2 % NCS. 48 horas después, cuando las placas de lisis fueron visibles al microscopio, se añadió el sustrato correspondiente al gen de selección del plásmido de inserción (X-gluc 0.03 %) en 1 ml de agar (1.9 %) y DMEM 2X (1:1) (Carroll & Moss, 1995). Las placas de lisis que desarrollaron color azul, correspondientes a los virus recombinantes, fueron aisladas, resuspendidas en 500 µl y utilizadas como inóculo para infectar nuevos cultivos en monocapa de BSC40. El proceso de selección se repitió al menos tres veces (plaqueos). Para confirmar la pureza de los virus recombinantes se llevó a cabo un análisis por PCR y también se evaluó la expresión de luciferasa lisando las células infectadas con los virus recombinantes con buffer de lisis (Promega) y midiendo la actividad luciferasa en presencia de luciferina y ATP mediante la utilización de un luminómetro Lumat LB 9501 (Berthold Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 3.2.2. Purificación de virus

La purificación de los virus por gradiente de sacarosa se realizó de acuerdo con el método descrito inicialmente por Joklik (Joklik, 1962) y Esteban (Esteban, 1984). Células BSC40 o BHK21 fueron utilizadas para la infección con los virus WR, M65 y M101 mientras que células CEF fueron utilizadas para la infección con MVA. Las distintas líneas celulares fueron infectadas a una multiplicidad de infección de 0.01 ufp/célula. Cuando el efecto citopático fue patente, se recogieron las células y se centrifugaron durante 15 min. a 2000 rpm, resuspendiéndose el precipitado en tampón Tris-HCl 10 mM pH 9.0. A continuación, se realizaron dos ciclos de sonicación/centrifugación (tres pulsos de 10 segundos/1500 rpm durante 15 minutos). Los sobrenadantes recogidos en cada ciclo se centrifugaron (1 hora a 20000 rpm a 4°C, en rotor SW28, Beckman) sobre un colchón de sacarosa al 36 % en Tris-HCl 10 mM pH 9.0. En el caso de los virus basados en MVA y WR el precipitado se recogió y se centrifugó sobre otro colchón de sacarosa en las mismas condiciones. En el caso de los virus mutantes M65 y M101, el precipitado se resuspendió y se volvió a centrifugar durante 20 minutos a 15000 rpm a 4°C en un gradiente de sacarosa desde 20 % a 45 % en Tris-HCl 10mM pH 9.0. La banda de virus se recogió y se volvió a centrifugar a 20000 rpm durante 45 minutos a 4°C para eliminar los restos de sacarosa. Los virus purificados se titularon, se dispensaron en pequeños volúmenes y se congelaron a -80°C hasta su utilización.

### 3.2.3. Titulación de virus

Para la infección de los cultivos celulares y la titulación de virus se han empleado las técnicas habituales detalladas en el libro de protocolos *Current protocols in molecular biology* (Earl y Moss, 1991).

La titulación de la cepa WR y M65 se realizó en la línea celular BSC40, bien en medio líquido o en medio sólido (agar 1.9 %: DMEM 2X, 1:1). A 48 ó 72 horas postinfección (en el caso de utilizar medio líquido o medio sólido, respectivamente), se tiñeron las células con cristal violeta (0.5 % en metanol al 20 %), revelándose las placas de lisis.

La titulación de los recombinantes basados en MVA y M101 se llevó a cabo por inmunotinción en las líneas celulares CEF, DF1 o BHK21, en el caso de MVA y BSC40 en el caso de M101. Monocapas de células se infectaron con distintas diluciones del virus y 36 ó 48 horas postinfección para MVA ó M101 respectivamente, se realizó la inmunotinción. Para ello, las monocapas infectadas se lavaron con PBS y se fijaron con metanol:acetona (1:1) durante dos minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas, se lavaron con PBS y se incubaron con una dilución 1:1000 de un anticuerpo policlonal de conejo frente a proteínas de vacinia en PBS + 3 % FCS durante 90 minutos en agitación suave a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo generado en cabra conjugado con peroxidasa (diluído 1:1000 en PBS + 3 % FCS) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con PBS dos veces y se reveló con una solución de 3,3'-diaminobenzidina tetrahydrochloride (DAB, Sigma) en PBS (0.83 mg/ml), suplementada con NiSO<sub>4</sub> 3 % (0.01 %) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (0.001 %). Tras la aparición de señal en las células infectadas la reacción se detuvo retirando la mezcla de revelado y lavando con PBS. El título se refirió como ufp/ml.

### 3.2.4. Curvas de crecimiento

Para analizar la eficiencia de replicación de las distintas cepas virales en las líneas celulares analizadas en este estudio, monocapas de células fueron infectadas a una multiplicidad de 0.01 ufp/célula con cada virus. Tras una adsorción de 60 min. a 37°C, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM fresco suplementado con 2 % FCS. A distintos tiempos postinfección se recogieron los sobrenadantes (que fueron mantenidos a 4°C hasta su titulación durante un tiempo nunca superior a 48 horas) para la determinación del virus liberado (EVs). Para el estudio de los MVs se lisaron las células mediante tres ciclos de congelación/descongelación y sonicación. Las partículas virales fueron contabilizadas por la técnica de inmunotinción descrita en el apartado 3.2.3.

## 3.3. Manipulación de proteínas

### 3.3.1. Purificación de la proteína LACK de *L. infantum*

Para purificar la proteína recombinante LACK-His se transformaron bacterias BL21 con el plásmido pRSETB-LACK-His, se plaquearon en placas de LB sólido suplementado con ampicilina a una concentración final de 75 µg/ml, y se cultivaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente se picaron placas y se crecieron 8 horas en 3 ml de LB (suplementado con 100 µg/ml de ampicilina) a 37°C con agitación. Se escaló el cultivo (en proporción 1:250) a un volumen de 500 ml y se indujo con IPTG a una concentración final de 0.5 mM, incubándose toda la noche a 37°C con agitación. El cultivo se centrifugó y las bacterias se lisaron con una solución a pH 8.0 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, Urea 8 M y NaCl 100 mM). A continuación se purificó el extracto por cromatografía de afinidad utilizando la resina TALON® (Clontech) que tiene elevada afinidad por la secuencia de histidinas localizada en el extremo amino terminal de la proteína LACK. La columna se lavó con soluciones de lisis con Imidazol a una concentración final de 10 mM y la elución se llevó a cabo con una solución con Imidazol 200 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, Urea 8 M, PIPES 200 mM y NaCl 500 mM). La proteína presente en las distintas fracciones eluidas se dializó utilizando columnas PD-10 Desalting Column (GE Healthcare), dejando la proteína en PBS. Seguidamente se comprobó su pureza en gel SDS-PAGE y su reactividad con anticuerpos específicos mediante transferencia Western. La determinación de la concentración de proteína se realizó mediante cuantificación por Bradford (Bio-Rad) comparando con una curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA).

### 3.3.2. Análisis de las proteínas en SDS-PAGE

Las muestras de proteínas fueron analizadas mediante electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE desnaturizantes) según el protocolo de Sambrook y cols (Sambrook *et al.*, 1989). El porcentaje de acrilamida varió dependiendo del peso molecular de la proteína de interés. Cuando fue necesario, los geles se fijaron en una solución que contiene 50 % isopropanol y 7 % ácido acético, y posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie (Sigma) al 1 % en metanol, diluido 1:50 en 7 % de ácido acético.



### 3.3.3. Transferencia de SDS-PAGE e inmunodetección en membrana (Western blot)

Para la transferencia de geles SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa se empleó el sistema semi-seco (Gelman Sciences) siguiendo el protocolo descrito por Towbin (Towbin *et al.*, 1979). Se empleó un sistema discontinuo de tres soluciones tamponadas de transferencia: Tampón A (300 mM Tris y 20 % metanol), Tampón B (25 mM Tris y 20 % metanol) y Tampón C (25 mM Tris, 40 mM ácido 6 amino-n-hexanoico y 20 % metanol). El gel y la membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) prehidratada en agua destilada, se colocaron entre papeles Whattman-3MM® empapados en estos tampones. La transferencia se efectuó a una intensidad de corriente constante de 200 mA durante 45 min. Se verificó la transferencia mediante tinción reversible con el colorante rojo Ponceau (0.2 % Ponceau en 3 % TCA; Sigma).

La membrana de nitrocelulosa se saturó con una solución de leche en polvo desnatada disuelta al 5 % en PBS a temperatura ambiente con agitación suave durante 20 min. La incubación con los anticuerpos se efectuó en esa misma solución de saturación. El anticuerpo primario se incubó a 4°C durante 16 horas, mientras que la incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante 90 min. a temperatura ambiente. Los lavados intermedios se realizaron en PBS con 0.05 % Tween 20 (PBST) con agitación a temperatura ambiente durante 15 min.

El revelado de las bandas de proteína reconocidas por los anticuerpos correspondientes se efectuó mediante el sistema luminol ECL® (Amersham), exponiendo una película autorradiográfica X-OMAT (Kodak).

## 3.4. Técnicas inmunológicas

### 3.4.1. Determinación de las células T secretoras de IFN $\gamma$ por el ensayo de ELISPOT

Para detectar las células T secretoras de IFN $\gamma$  específicas de antígeno se utilizó el ensayo de ELISPOT (Miyahira *et al.*, 1995). En resumen, placas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa (Millipore) se cubrieron con 75  $\mu$ l/pocillo de una solución del anticuerpo monoclonal de rata anti-IFN $\gamma$  murino (clon R4-6A2, Pharmingen, San Diego, CA) a una concentración de 6  $\mu$ g/ml en PBS. Tras incubarlo toda la noche a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos tres veces con medio RPMI y finalmente se incubó con medio suplementado con 10 % FCS durante al menos una hora a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Los bazo de los animales inmunizados se recogieron en medio RPMI + 10 % FCS y se homogenizaron en un separador celular (Falcon). Las células disgregadas se centrifugaron durante 5 min. a 1500 rpm a 4°C, y se lavaron dos veces con RPMI + 10 % FCS. Se lisaron los eritrocitos añadiendo NH<sub>4</sub>Cl 0.1 M (2 ml/bazo) durante 3-5 min. a 4°C. Transcurrido este tiempo se añadió RPMI + 10 % FCS y se centrifugó, se lavó dos veces más con RPMI + 10 % FCS y finalmente las células se resuspendieron en 5 ml de RPMI + 10 % FCS. Se contó el número de esplenocitos vivos mediante tinción con azul tripan (4 % en agua; Sigma).

Las células presentadoras profesionales utilizadas en este ensayo fueron las propias presentadoras presentes en el bazo. En el caso de evaluar la respuesta específica frente a la proteína LACK,  $10^7$  esplenocitos se reestimularon con 25  $\mu\text{g/ml}$  de la proteína sonicada. El lisado ASL se utilizó a una concentración final de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Finalmente para analizar la respuesta frente a los antígenos de vaccinia, se pulsaron los esplenocitos con el péptido VGPSNSPTF de la proteína de vaccinia E3 a una concentración final de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de  $10^7$  esplenocitos/ml y diluciones 1/2 (1/3 en el caso de esplenocitos estimulados con el péptido E3). Las placas se incubaron durante 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5 %, se lavaron 5 veces con PBST, y se incubaron con 2  $\mu\text{g/ml}$  del anticuerpo monoclonal de rata anti-IFN $\gamma$  biotinilado XMG1.2 (Pharmingen) diluido en PBST, durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las placas 5 veces con PBST y se añadió una dilución 1/800 de avidina-peroxidasa (0.5  $\text{mg/ml}$ ; Sigma). Tras 1 hora a temperatura ambiente se lavó 3 veces con PBST y dos con PBS, añadiéndose finalmente la mezcla de revelado: 1  $\mu\text{g/ml}$  del sustrato DAB (Sigma), resuspendido en Tris-Cl 50 mM pH 7.5, 0.015 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reacción se detuvo lavando la placa con abundante agua, y una vez seca se realizó el recuento de los puntos con la ayuda del software AID ELISPOT reader system (Vitro).

### 3.4.2. Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo

Los esplenocitos se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo cóncavo ( $4 \times 10^6$  células en 100  $\mu\text{l}$  de RPMI 10 % FCS). Se añadió 100  $\mu\text{l}$  del estímulo a las mismas concentraciones utilizadas para el ELISPOT. En los grupos control se estimuló con un preparado comercial de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), Ionomicina y Brefeldina (Leukocyte Activation Cocktail, BD Biosciences) a la concentración recomendada por el fabricante. Tras dos horas de incubación se añadió Brefeldina (1  $\mu\text{l}$ /pocillo) para inhibir el transporte intracelular y se dejó incubar 4 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Las células se lavaron (centrifugación a 1500 rpm, agitación del botón de células y adición de 200  $\mu\text{l}$  de PBS) dos veces, se añadieron 100  $\mu\text{l}$ / pocillo de PBS con Violet Dye (0.5  $\mu\text{l/ml}$ ; Invitrogen) para evaluar la viabilidad celular y se incubó 30 min. a  $4^\circ\text{C}$  y en oscuridad. Se dieron dos lavados y se añadió el marcaje de superficie 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de las distintas diluciones de los anticuerpos (según lote) en PBS con 2 % FCS. Se incubó 20 min. a  $4^\circ\text{C}$  y en oscuridad. Se realizaron dos lavados y se añadió Cytofix/Cytoperm (100  $\mu\text{l}$ /pocillo; BD Biosciences) para permeabilizar las células y se dejó toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  y oscuridad. Al día siguiente se hizo un lavado con Permwash 1X (PW; BD Biosciences) y se añadió FcBlock (Purified  $\alpha$ -Ratón CD16/CD32 Fc $\gamma$  type III/II, Pharmingen) diluido 1:250 en PW para bloquear los receptores Fc y se incubó 15 min a  $4^\circ\text{C}$  y oscuridad. Se realizó otro lavado y se añadió el marcaje intracelular, 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de diferentes diluciones de los anticuerpos en PW y incubándose 30 min. a  $4^\circ\text{C}$  y oscuridad. Por último se dieron dos lavados con PW y se resuspendieron las células en 400  $\mu\text{l}$  de PBS suplementado con 2 % de FCS. Las muestras fueron analizadas utilizando un citómetro LSR II (BDBiosciences).

### 3.4.3. Análisis de proliferación

Los esplenocitos se lavaron con PBS y se tiñeron con el marcador CFSE (CarboxyFluoresceina diacetato Succinimidil Ester) (Celltrace™ CFSE Cell proliferation Kit, Invitrogen) a una concentración final de 25  $\mu\text{M}$  durante 7 min. Tras el marcaje se añadió un volumen de



FCS durante un minuto a temperatura ambiente.  $10^6$  esplenocitos por condición se sembraron en una placa de 48 pocillos y se dejaron estimulando con la proteína LACK a una concentración final de 25  $\mu\text{g/ml}$  durante 6 días. Posteriormente las células se centrifugaron 5 min. a 1500 rpm, se lavaron dos veces y se marcaron y evaluaron como se explica en la sección de análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo.

### 3.4.4. Inmunohistoquímica

Pulmones de animales infectados con los distintos virus fueron aislados y fijados en paraformaldehído al 4% durante 12 horas a 4°C, lavados con PBS y mantenidos en etanol al 70% a 4°C. A continuación, se deshidrataron, se embebieron en parafina y se realizaron cortes sucesivos de 5  $\mu\text{m}$ . Para los estudios de histopatología, parte de las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina. Para inmunohistoquímica, las muestras se desparafinaron mediante un tratamiento con Xilol (20 min.) y se rehidrataron mediante un tratamiento secuencial con distintas graduaciones de etanol. Las muestras se lavaron con agua destilada y se dejaron en TBS. Para desenmascarar epítomos de los distintos antígenos virales, se hirvieron las muestras durante 10 min. en una olla a presión en tampón citrato (10 mM Citrato Sódico, pH=6, 0.05 % Tween 20). El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó mediante la inmersión de las muestras en una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % durante 10 min. Las muestras se trataron con una solución de bloqueo (PBS 1X, suero de cabra 10%, 1 % BSA, 0.1 % Triton X-100) en una cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario R $\alpha$ WR (1:2000 en PBS). Tras varios lavados en TBS las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:750 de anticuerpo secundario biotinilado Cabra $\alpha$ Conejo IgG en PBS 1X suplementado con 1 % de BSA seguido de la aplicación del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA). Se detectó la unión de anticuerpos mediante el uso de 3-3'-Tetracloro-Diaminobenzidina (Sigma, Saint Louis, MO, USA). A continuación, se realizó una tinción con hematoxilina Mayer's (Sigma, Saint Louis, MO, USA), se deshidrataron de nuevo las muestras y se montaron en medio de montaje Micromount (Surgipath, Peterborough, UK). Las imágenes se tomaron con un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Germany), usando la tecnología NIKON DIGITAL SIGHT para capturar las imágenes en formato TIFF.

## 3.5. Manipulación con animales

En todos los ensayos con animales se utilizaron ratones hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, obtenidos de Harlan Inc.

### 3.5.1. Protocolos de inmunización

En los ensayos de replicación de los mutantes los animales fueron inmunizados con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón por vía intraperitoneal en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  de PBS.

Para la determinación del grado de patogénesis inducido por los virus mutantes, los animales fueron anestesiados con isofluorano (IsoFlo, Esteve) e inoculados por vía intranasal con  $10^5$  ufp/ratón de WR y  $10^7$  ó  $10^8$  ufp/ratón de los virus M65 y M101, respectivamente, en un volumen final máximo de 30  $\mu\text{l}$  de PBS.

En todos los ensayos de caracterización de respuesta inmunológica y en los ensayos de protección se empleó un protocolo heterólogo, basado en una primera dosis de inmunización con 100 µg de ADN plasmídico recombinante para el antígeno LACK (con el plásmido pCINeo-LACK) seguida, 14 días después, de una segunda dosis de inmunización con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de virus vaccinia recombinantes para el mismo antígeno. La inoculación del ADN se realizó por vía intradérmica en la zona abdominal, inoculándose 100 µg de ADN en 100 µl de agua estéril libre de pirógenos. Los virus recombinantes se inocularon en la cavidad intraperitoneal en un volumen total de 200 µl de PBS estéril. Los virus empleados en todas las inmunizaciones fueron purificados por gradiente (M65 y M101) o doble colchón de sacarosa (MVA) para asegurar su pureza.

Para la evaluación de la respuesta inmunológica, los animales fueron sacrificados 11 días después de la segunda dosis (día 25) para caracterizar la respuesta inmunológica adaptativa ó 53 días después de la segunda dosis (día 67) para analizar la respuesta inmunológica de memoria.

Para los ensayos de protección los animales fueron desafiados según se describe a continuación. En los ensayos en los que se ha utilizado la cepa de leishmania *L. major* se han realizado dos desafíos distintos: el primero consistente en  $5 \times 10^4$  promastigotes metacíclicos tres semanas después de la segunda inmunización (día 35) y el segundo consistente en la misma dosis de parásito inoculada pasados 53 días de la inmunización (día 67). En los ensayos en los que se ha utilizado la cepa *L. amazonensis* se inocularon  $2 \times 10^4$  promastigotes estacionarios pasados 53 días de la inmunización con los distintos virus (día 67).

### 3.5.2. Obtención de muestras de los animales inmunizados

Para la obtención de los sueros, se recogió la sangre de los animales después de su sacrificio mediante inyección intracardíaca a diferentes tiempos postinoculación según el experimento. La sangre se incubó 1 hora a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C. La sangre se centrifugó durante 20 min. a 3000 rpm, obteniéndose de este modo el suero, que fue almacenado a -80°C hasta su utilización. A distintos tiempos postinoculación también se extrajo el bazo para determinar los parámetros inmunológicos.

Para los estudios de replicación de virus *in vivo* se extrajeron a distintos tiempos postinfección las células del peritoneo mediante lavados con 10 ml de PBS estéril.

### 3.5.3. Determinación de los niveles de luciferasa *ex vivo*

La expresión génica de los virus recombinantes en los diferentes tejidos se evaluó mediante el ensayo de luciferasa descrito previamente por Rodríguez y colaboradores en 1988 (Rodríguez *et al.*, 1988). Los diferentes tejidos de los ratones individualizados fueron homogenizados en un tampón de extracción de luciferasa (Promega) con la utilización de un homogenizador Ultraturrax T8 (Janke & Kunkel). La actividad luciferasa se midió en presencia de luciferina y ATP mediante la utilización de un luminómetro Lumat LB 9501 (Berthold Technologies) siguiendo las indicaciones del fabricante. La señal de luciferasa se expresó como Unidades Relativas de Luciferasa (URL) por mg de proteína. El contenido proteico de los diferentes tejidos se determinó utilizando el kit comercial BCA (Pierce Biotechnology).

### 3.5.4. Infección con *Leishmania*

#### 3.5.4.1. Mantenimiento de los cultivos de *Leishmania spp*

Los parásitos se crecieron en estufa a 27°C en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> en un volumen de medio de 5 ml. En el manejo de los cultivos de parásitos se emplearon siempre técnicas estériles y se tomaron las precauciones indispensables según la normativa europea vigente para el cultivo de agentes patógenos. Los promastigotes se almacenaron en medio de congelación (90 % FCS, 10 % DMSO) en nitrógeno líquido en viales que contenían aproximadamente 10<sup>8</sup> promastigotes/ml.

Para preservar la infectividad de los parásitos, se realizaron infecciones periódicas en ratones BALB/c sin inmunizar, obteniéndose los promastigotes a partir de las lesiones producidas. Para ello, se iniciaron cultivos a partir de un homogeneizado de una lesión o nódulo linfático, y tras la obtención de promastigotes en fase estacionaria, se centrifugó todo el volumen de los cultivos dos veces (3000 rpm, 4°C, 15 min.). Las muestras de cultivo se diluyeron 1:4 en formaldehído (Merck) y se estimó la densidad del cultivo en una cámara de Neubauer (BlueBrand), obteniéndose el número de promastigotes/ml.

En el caso de *L. amazonensis*, los parásitos obtenidos a partir de aspirados se diluyeron al menos dos veces, utilizando diluciones 1:200 ó 1:2000 de los cultivos, con el fin de obtener promastigotes sincronizados. Una vez diluidos dos veces los cultivos obtenidos por aspirados de ratones infectados, se dejaron 5 días en cultivo hasta alcanzar la fase estacionaria y se lavaron con PBS previamente a su inoculación.

#### 3.5.4.2. Infección experimental con *L. Major*

Las infecciones experimentales en ratones se llevaron a cabo con promastigotes metacíclicos vivos de *L. major* en fase estacionaria de crecimiento (8-9 días de cultivo). Los promastigotes metacíclicos se obtuvieron mediante aglutinación con lectina de cacahuete (PNA). Los promastigotes procíclicos no infectivos se unen a la aglutinina de cacahuete, mientras que los promastigotes metacíclicos infectivos no se unen a ella, lo que permite un método de selección de promastigotes infectivos a partir de cultivos *in vitro*. Los parásitos se lavaron dos veces con 50 ml de medio Schneider's completo, centrifugando durante 15 min. a 3000 rpm. El precipitado obtenido se resuspendió en PBS y, tras estimar la concentración de promastigotes, se llevaron a una densidad de 1 a 2x10<sup>8</sup> promastigotes/ml. Se llevó a cabo la incubación con PNA (10 mg/ml, Sigma) durante 30 min. a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugó la mezcla a 1000 rpm durante 5 min. En el precipitado se eliminan los promastigotes no infectivos, mientras que en el sobrenadante se recogen los promastigotes metacíclicos infectivos. Tras dos lavados, se resuspendieron los promastigotes en PBS. Para la inoculación se utilizaron jeringas MicroFine 30G (BD Healthcare).

#### 3.5.4.3. Infección experimental con *L. amazonensis*

En el caso de *L. amazonensis* los parásitos obtenidos a partir de lesiones de animales infectados se diluyeron al menos dos veces consecutivas, utilizando diluciones 1:200 o 1:2000 de los cultivos, con el fin de obtener promastigotes sincronizados. Una vez pasados dos veces se dejaron 5 días en cultivo hasta alcanzar la fase estacionaria. Tras lavar dos veces con PBS, los promastigotes se dejaron a 2x10<sup>6</sup> promastigotes/ml para inocular 2x10<sup>4</sup> promastigotes por ratón en la almohadilla plantar, en un volumen final de 10 µl.

#### 3.5.4.4. Medida de la lesión en la almohadilla plantar

Semanalmente se midió la almohadilla plantar de las dos extremidades posteriores de los ratones con un calibre digital (Mauser Digital) siguiendo el protocolo descrito por Champsi y McMahon-Pratt (Champsi & McMahon-Pratt, 1988). Los datos aparecen expresados en milímetros como la diferencia de la medida transversal de la almohadilla infectada y la no infectada. Las medidas fueron realizadas siempre por la misma persona y con el mismo calibre.

### 3.6. Análisis estadístico

---

El análisis estadístico de los datos para determinar la significancia de las diferencias encontradas entre los distintos grupos se realizó mediante el test de análisis de la varianza (ANOVA). Para analizar las diferencias entre dos grupos se realizó un test *t* de Student. Se consideraron significativos valores de *p* menores de 0.05: \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,005$ .

Para el análisis estadístico de los datos de citometría utilizamos una aproximación que corrige la respuesta obtenida en el grupo control de estimulación (RPMI) y al mismo tiempo permite el cálculo de intervalos de confianza y *p* valores de las distintas hipótesis. (Nájera *et al.*, 2010; Garcia-Arriaza *et al.*, 2011).



Resultados

Resultados

Resultados

Resultados

Resultados

4



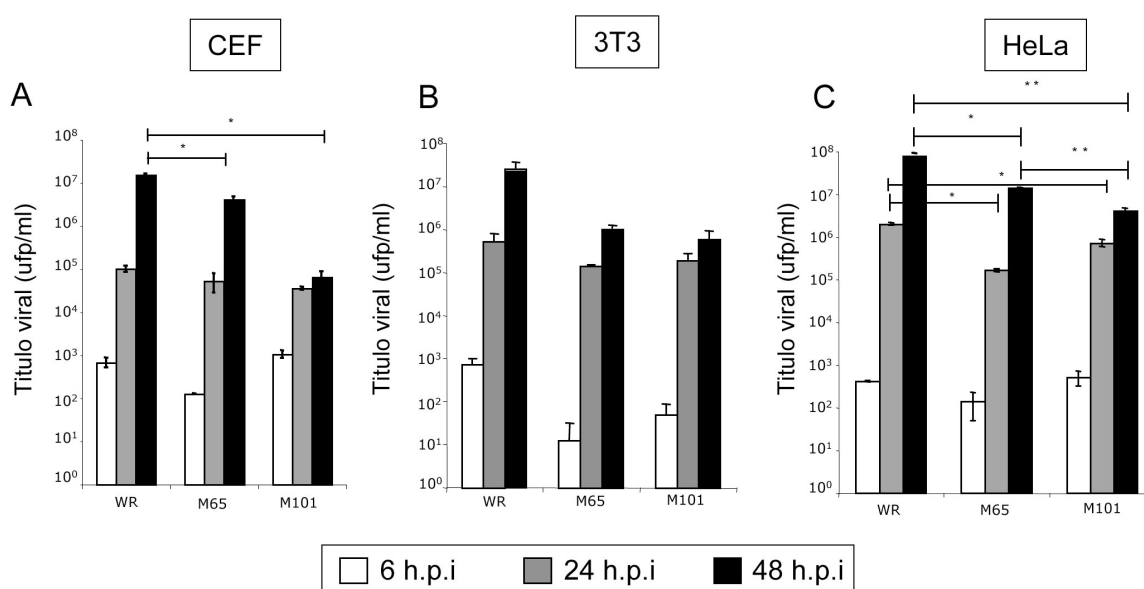




## 1. Análisis de la capacidad de replicación de los virus mutantes M65 y M101 en diferentes líneas celulares

Para comparar y cuantificar la capacidad replicativa de los diferentes virus mutantes decidimos realizar curvas de crecimiento en líneas celulares de ave (CEF), murinas (3T3) y humanas (HeLa). De este modo infectamos monocapas de células a una multiplicidad de infección de 0.01 ufp/célula con cada virus. A distintos tiempos postinfección las partículas virales que permanecían asociadas a la célula (MVs) o aquellas habían sido liberadas durante el curso de la infección (EVs) fueron cuantificadas. El rendimiento viral de las cepas mutantes fue comparado con el de la cepa competente en replicación VACV-WR que fue incluida como control en el presente análisis.

Como se puede observar en la Figura 8A, a 48 horas postinfección existen diferencias significativas en la producción de MV en células CEF infectadas con la cepa parental WR en comparación con los virus mutantes. La cepa M65 mostró una leve pero significativa reducción en comparación con el virus parental WR, mientras que la cepa M101 mostró una marcada reducción (superior a 2 logaritmos) respecto a la cepa silvestre WR ( $p=0.02$ ) y también frente a la cepa mutante M65 a 48 horas postinfección ( $p=0.058$ ). Cuando titulamos los sobrenadantes de las células CEF infectadas para estimar la producción de EVs, también observamos una reducción en el rendimiento viral con una tendencia similar a la observada en los MVs, aunque estas reducciones no fueron significativas (datos no mostrados).



**Figura 8. Rendimiento de los mutantes M65 y M101 en distintas líneas celulares.** Células CEF, 3T3, y HeLa fueron infectadas a una multiplicidad de infección de 0.01 ufp/célula con los virus M65, M101 o VACV-WR. A los tiempos indicados las células infectadas fueron recogidas, sometidas a tres ciclos de congelación/descongelación, sonicación y fueron tituladas en monocapas de la línea permisiva BSC40 (A,B,E). (\*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.005$ ; \*\*\*  $p<0.0005$ ).

En células 3T3 infectadas con los diferentes virus mutantes no se observaron diferencias estadísticas en la producción de MVs (Figura 8B) o EVs a ninguno de los tiempos evaluados. En células HeLa la producción de MVs a 24 hpi fue menor en ambos mutantes comparados con la cepa parental. Estas diferencias se mantuvieron a 48 hpi aunque a este tiempo la cepa M101 presentó un rendimiento viral menor al observado tanto por la cepa M65 ( $p=0.004$ ) como WR ( $p=0.003$ ) (Figura 8C). Una reducción de un logaritmo fue observada en la producción de EVs en ambos virus mutantes en comparación con la cepa parental (datos no mostrados).

En conjunto, los resultados de la Figura 8 demuestran que los virus mutantes M65 y M101 son capaces de replicar en las distintas líneas celulares aviares y de mamífero ensayadas, aunque el rendimiento viral obtenido tanto en forma de MV como EV se encuentra reducido en comparación con el virus parental WR. Esta reducción se observó mayoritariamente en las líneas celulares CEF y HeLa y fue más pronunciada en el mutante M101.

## ■ 2. Estudio comparativo del comportamiento *in vivo* de los virus mutantes M65 y M101

Para analizar el comportamiento *in vivo* de los virus M65 y M101, hemos recurrido a la técnica de bioluminiscencia (BLI) que ofrece la posibilidad de estudiar procesos biológicos en organismos vivos. Esta técnica está basada en la detección de luz visible emitida tras la descarboxilación oxidativa de la luciferina, una reacción que es catalizada por la enzima luciferasa en presencia de ATP y oxígeno (Sadikot & Blackwell, 2005). Esta tecnología se ha aplicado en numerosos estudios para monitorizar, por ejemplo, la expresión de un determinado gen utilizado en terapia génica o para analizar la producción de metástasis o el crecimiento tumoral (Doyle *et al.*, 2004; Edinger *et al.*, 1999; Ray *et al.*, 2004). En el laboratorio hemos demostrado que el gen de la luciferasa es un marcador ideal para estudiar la replicación y analizar la expresión de antígenos heterólogos en ratón (Gómez *et al.*, 2007; Nájera *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 1988).

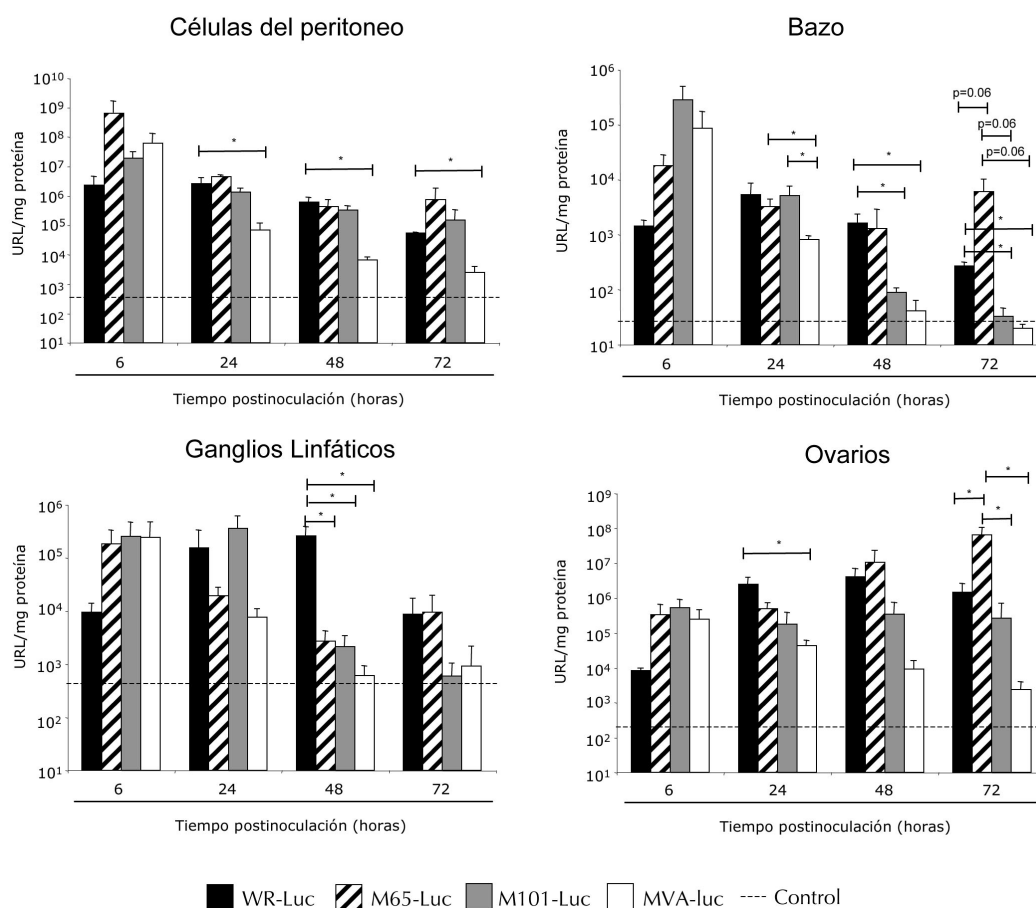
Para realizar este estudio se generaron virus recombinantes basados en las cepas M65 y M101 que expresaban el gen de la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* (como se explica en la sección Materiales y Métodos). Como controles positivo y negativo de replicación se utilizaron la cepa parental WR y la cepa atenuada MVA que expresaban la luciferasa (WR-Luc y MVA-luc, respectivamente) que han sido descritos previamente (Gómez *et al.*, 2007). El gen de la luciferasa en los cuatro virus se encuentra insertado en el locus de la timidina quinasa (TK) y su expresión está regulada bajo el control transcripcional del promotor viral sintético temprano/tardío ( $p_{7.5}$ ).

### 2.1. Biodistribución de los mutantes M65 y M101 por ruta sistémica

Para estudiar la biodistribución de los distintos virus mutantes, se inocularon ratones BALB/c con una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de los virus WR-Luc, M65-Luc, M101-Luc o MVA-Luc por una ruta sistémica como es la ruta intraperitoneal. Los animales fueron sacrificados a 6, 24, 48 y 72 horas postinfección, extrayéndose de los mismos el bazo, los ganglios, los ovarios y las células

obtenidas de lavados peritoneales. Los órganos fueron homogenizados y en ellos se estudió la actividad luciferasa y la producción viral. Como había sido observado previamente (Gómez *et al.*, 2007), la actividad luciferasa fue detectada en todos los tejidos extraídos de ratones infectados con el virus WR-Luc. Un comportamiento similar pudo observarse en los ratones infectados con el virus M65-Luc que mostró niveles comparables o superiores de luciferasa en todos los órganos, sobre todo en ovarios y bazo a 72 horas postinfección (Figura 9). La actividad luciferasa en ratones infectados con M101-Luc mostró un claro descenso en ganglios linfáticos y bazo, mientras que se mantuvo estable hasta las 72 horas en lavados peritoneales y ovarios.

Los datos de actividad luciferasa correlacionaron con la presencia de partículas virales infectivas a los distintos tiempos postinfección, observándose altos niveles de carga viral a 72 horas postinfección en ovarios o lavados peritoneales en el caso de animales infectados con M65-Luc o WR-Luc. Sin embargo, en los animales infectados con MVA-Luc o M101-Luc la presencia de partículas virales infectivas fue baja o indetectable a partir de las 24 horas postinfección en la mayoría de los órganos (datos no mostrados).



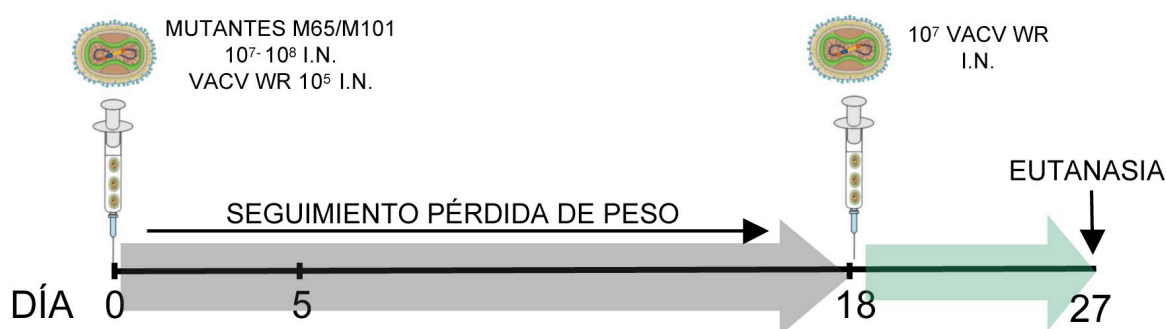
**Figura 9. Cinética de expresión de luciferasa en órganos de animales infectados con WR-Luc, M65-Luc, M101-Luc o MVA-Luc.** Ratones BALB/c fueron inoculados por vía intraperitoneal con una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de WR-Luc, M65-Luc, M101-Luc o MVA-Luc. Los tejidos fueron recogidos a 6, 24, 48 y 72 horas postinfección y la expresión de luciferasa expresada como URL/mg de proteína se determinó como se ha descrito en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media de valores obtenidos de muestras de tres animales por virus y tiempo. La línea control indica los niveles de luciferasa endógenos de cada órgano en un animal no inmunizado (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ).

En conjunto, estos resultados demuestran que los virus M65 y M101 tienen una capacidad replicativa diferencial *in vivo*. Mientras que el virus M65-Luc es capaz de alcanzar altos títulos y niveles de luciferasa comparables o superiores a la cepa parental WR-Luc, el virus M101-Luc muestra una capacidad replicativa limitada a órganos como el ovario o las células de la cavidad peritoneal, descritos como las células en las que mejor se desarrolla la infección por vaccinia por vía intraperitoneal. En el resto de los órganos, como en el bazo o los ganglios linfáticos, los niveles de expresión de luciferasa o de partículas infectivas era más similar a los obtenidos en animales inoculados con el virus MVA-Luc, que es deficiente en replicación en células de ratón.

Esta diferencia de replicación, y sobre todo de expresión del antígeno heterólogo, convierte a ambos virus en perfectos candidatos para estudiar hasta qué punto la expresión mantenida en el tiempo de un antígeno heterólogo puede modular la respuesta inmunológica frente al mismo y qué implicaciones puede tener en el desarrollo de una respuesta protectora frente a un patógeno determinado.

## 2.2. Patogenicidad de los virus M65 y M101 en ratones BALB/c

Una vez caracterizada la capacidad replicativa de las cepas M65 y M101, decidimos estudiar su patogenicidad *in vivo*, y así evaluar su seguridad con respecto a la cepa parental WR. Para ello, se inocularon ratones BALB/c por ruta intranasal con una dosis letal ( $10^5$  ufp/ratón) del virus parental WR, o con 100 ó 1000 dosis letales de los virus mutantes M65 y M101 ( $10^7$  ó  $10^8$  ufp/ratón, respectivamente). Diariamente se monitorizó la pérdida de peso así como otros parámetros de enfermedad (ausencia de acicalamiento/ pelo erizado, movilidad limitada, encorvamiento o inflamación de la membrana periocular). Puede observarse un esquema de la inmunización en la Figura 10.

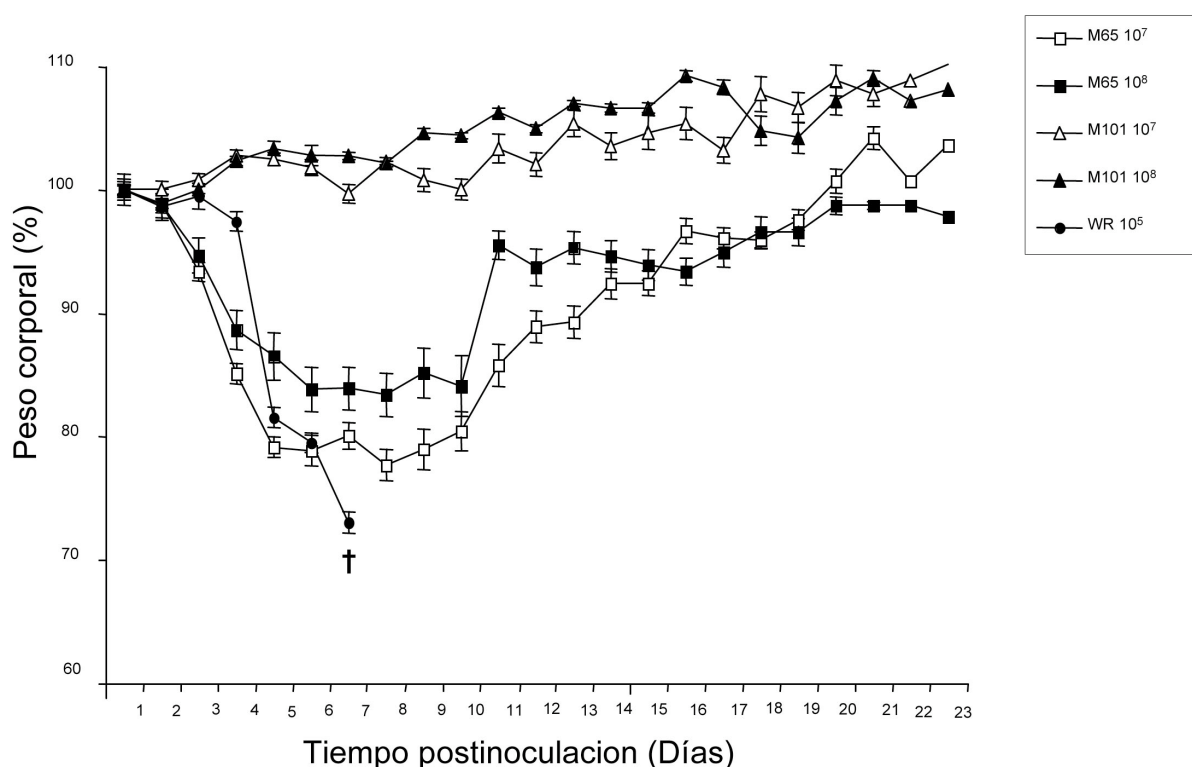


**Figura 10. Esquema del protocolo de inmunización seguido para el estudio de patogenicidad de los virus mutantes M65 y M101.** Ratones BALB/c fueron inoculados por ruta intranasal con una dosis de  $10^7$  ó  $10^8$  ufp/ratón de los virus M65 o M101 y con una dosis de  $10^5$  ufp/ratón del virus parental WR. A los 18 días postinoculación, los animales fueron desafiados con 100 dosis letales de WR ( $10^7$  ufp) por vía intranasal.

Como puede observarse en la Figura 11, todos los animales infectados con la dosis letal de WR experimentaron una severa pérdida de peso y presentaron signos de enfermedad como pelo erizado, movilidad limitada y encorvamiento (dato no mostrado), y tuvieron que ser sacrificados por motivos éticos a los 6 días postinfección.

Los animales infectados con el virus M65 presentaron los mismos signos de enfermedad que los animales infectados con el virus WR a las dos dosis ensayadas, pero en un grado inferior a los mismos. También sufrieron una marcada pérdida de peso, con un máximo a día 6 postinfección, punto en el que los animales comenzaron a ganar peso y a perder gradualmente los signos de enfermedad.

Sin embargo, los animales infectados con el mutante M101 no desarrollaron ningún signo de enfermedad ni perdieron peso alguno a lo largo del experimento.



**Figura 11. Monitorización de la pérdida de peso durante la duración del experimento.** Ratones BALB/c fueron inoculados por ruta intranasal con una dosis de  $10^7$  o  $10^8$  ufp/ratón de los virus M65 o M101 y con una dosis de  $10^5$  del virus parental WR. La pérdida de peso se monitorizó a diario así como distintos parámetros de enfermedad.

A día 5 postinfección, un animal representativo de cada grupo fue sacrificado y se estudió la inmunopatología de los tejidos de los pulmones de los animales infectados. Se realizó primero una tinción de Hematoxilina/Eosina (H/E) de diferentes secciones de los pulmones para identificar signos de infección en el tejido como son: la extravasación de leucocitos y su acumulación, la modificación del epitelio bronquiolar y la presencia de hemorragias intersticiales. También decidimos estudiar la presencia de proteínas virales de vaccinia por inmunohistoquímica.

Como se muestra en la Figura 12, los pulmones de animales infectados con el virus WR mostraron altos niveles de extravasación y acumulación leucocitaria, una severa inflamación del epitelio bronquiolar y hemorragias intersticiales. La presencia de proteínas virales detectadas mediante inmunohistoquímica en las áreas de los pulmones que presentan un fenotipo patológico, evidencian el papel de la infección por vaccinia en el desarrollo de los signos de patología.

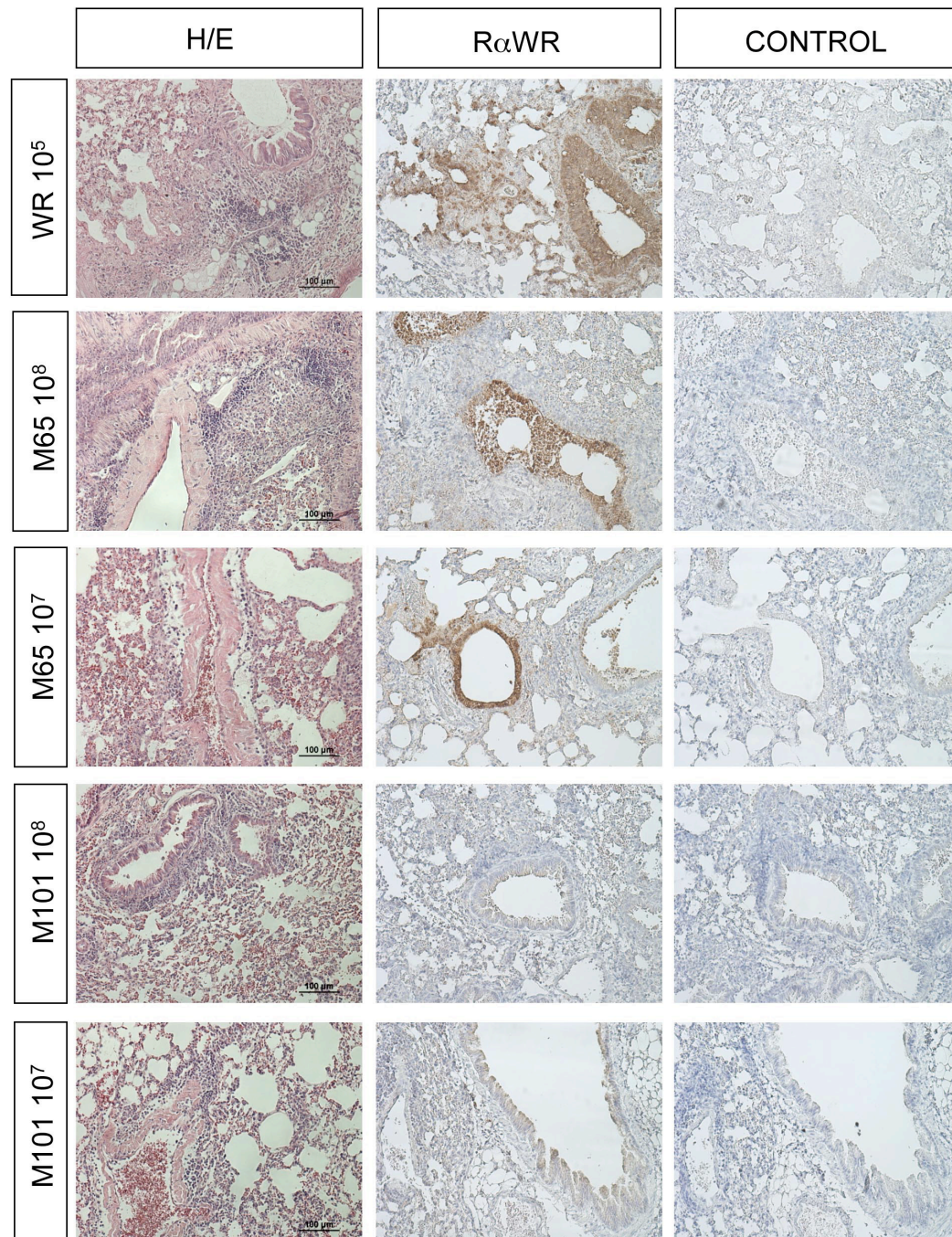
Resultados similares fueron obtenidos en los grupos inoculados con  $10^8$  ufp/ratón del virus M65. En estos animales la modificación del epitelio fue reducida en comparación con la observada en el grupo infectado con el virus WR. Además, en los animales infectados con  $10^7$  ufp/ratón del mismo virus, tanto la modificación del epitelio como la acumulación y extravasación leucocitarias fueron menos pronunciadas. La tinción de las áreas infectadas confirmó también el papel de la infección por el M65 en las áreas afectadas.

Los pulmones de animales infectados con ambas dosis del virus M101 mostraron fenómenos de extravasación y acumulación leucocitarias, pero la modificación del epitelio fue mucho menos agresiva y el colapso de los bronquiolos también resultó menos evidente que en el caso de los pulmones de ratones infectados con WR o con el mutante M65. La tinción específica con anticuerpos policlonales frente a vaccinia mostró una presencia residual de proteínas virales en el pulmón. Cuando los animales superaron la primera infección decidimos estudiar si dicho fenómeno sería capaz de producir inmunidad frente a la infección por la cepa parental WR. Para responder a esta pregunta  $10^7$  ufp del virus WR (100 dosis letales) fueron inoculadas a cada ratón por vía intranasal.

Ninguno de los animales, tanto de los grupos infectados con diferentes dosis del virus M65, como los infectados con M101, desarrollaron ningún signo de patología ni pérdida de peso tras la infección.

Todos estos resultados en conjunto demuestran que los virus mutantes presentan una reducción en la patogénesis en comparación con el virus parental WR. Sin embargo, el virus M101 presenta un mayor grado de atenuación en comparación con el virus M65, aunque ambos virus son capaces de generar inmunidad frente a un desafío letal con el virus parental WR.





**Figura 12. Estudio histopatológico de pulmones de ratones BALB/c infectados con las diferentes dosis de los virus mutantes M65, M101 o WR.** A día 5 postinfección un animal representativo de cada grupo se sacrificó y se extrajeron los pulmones para realizar estudios histológicos. Se realizó una tinción de los cortes con Hematoxilina/Eosina para identificar síntomas de infección de tejidos (paneles H/E). También se estudió la presencia de proteínas virales de vaccinia por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal frente al virus vaccinia (paneles R $\alpha$ WR). Secciones incubadas únicamente con anticuerpo secundario se utilizaron como control de tinción (paneles CONTROL).



### 3. Estudio comparativo de los genomas de los virus mutantes M65 y M101

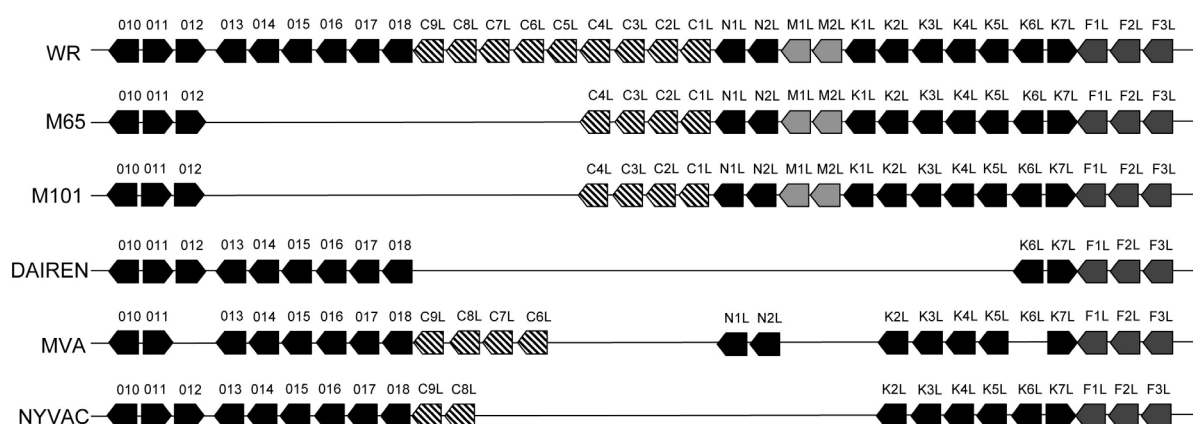
Todos los resultados descritos hasta el momento muestran la existencia de claras diferencias en el comportamiento entre las cepas virales M65 y M101 tanto en células en cultivo como *in vivo*. Por esta razón, quisimos realizar un estudio comparativo de los genomas virales y analizar los posibles genes responsables del comportamiento diferencial.

Para ello se extrajo ADN viral de preparaciones de virus purificado a través de gradiente. La preparación de la biblioteca se realizó conforme a las recomendaciones de *Illumina* tal y como se describe en Materiales y Métodos.

#### 3.1. Características generales de las secuencias genómicas de los virus mutantes

Las secuencias de ADN lineal de doble cadena de los virus M65 y M101 presentaron un porcentaje de guanina-citosina (GC) y de adenina-timina (AT) idéntico al virus parental WR (33 % GC y 66 % AT).

Como se muestra en la Figura 13, los virus mutantes M65 y M101 comparten una delección común en el flanco izquierdo del genoma que comprende los genes *C5L*, *C6L*, *C7L*, *C8L*, *C9L*, *VACWR013*, *VACWR014*, *VACWR015*, *VACWR016*, *VACWR017* y *VACWR018*. Los genes *C5L*, *C8L* y *C9L* codifican proteínas de función desconocida o proteínas hipotéticas. El gen *C6L* codifica una proteína inmunomoduladora que bloquea la inducción de INF $\beta$  (García-Arriaza *et al.*, 2011; Unterholzner *et al.*, 2011). El gen *C7L* codifica una proteína implicada en rango de hospedador (Nájera *et al.*, 2010), mientras que el gen *VACWR013* (*C12L* en nomenclatura Copenhague) codifica una proteína de vaccinia de unión al receptor de IL-18 (Symons *et al.*, 2002). Los genes *VACWR014*, *VACWR015*, *VACWR016*, *VACWR017* y *VACWR018* codifican proteínas de la familia de las anquirinas involucradas en rango de hospedador.

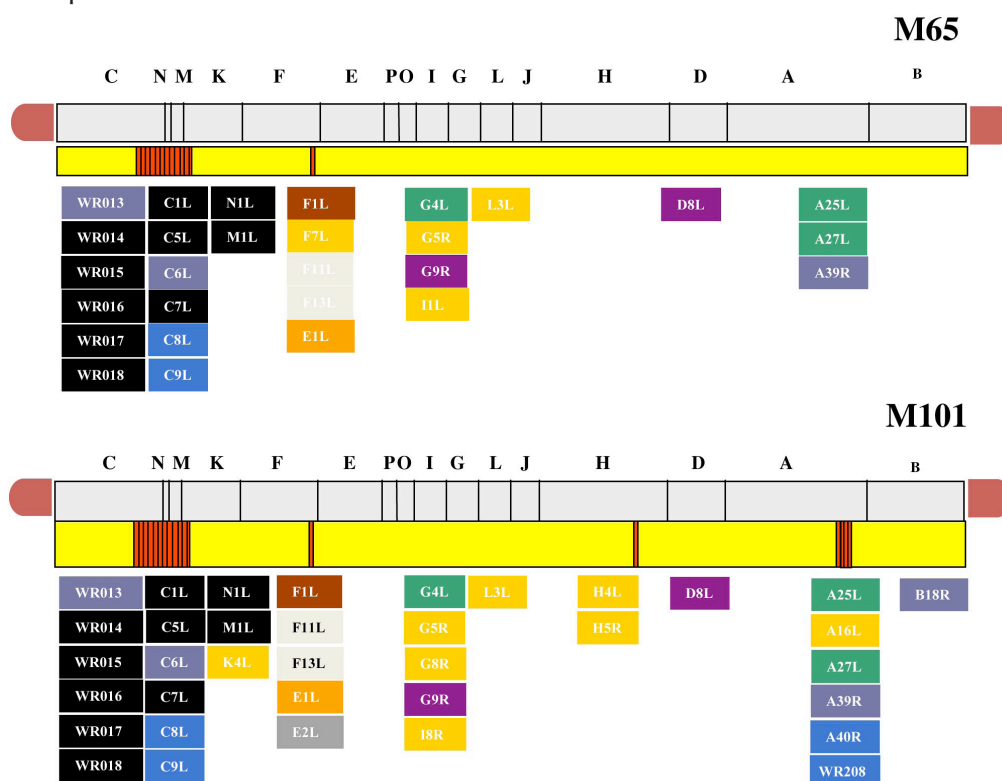


**Figura 13.** Esquema de las delecciones del extremo izquierdo del genoma de los virus mutantes M65 y M101 en comparación con las presentes en la misma región de diferentes cepas vacunales del VACV.

Además de la delección observada en el flanco izquierdo del genoma, el virus M101 contiene una pequeña delección en el flanco derecho del genoma, que comprende los genes *A39R* (truncado en el genoma de WR y por lo tanto también en el de M65) que codifica una semaforina proinflamatoria (Gardner *et al.*, 2001) y el gen *A40R*, de función desconocida, pero que constituye la primera proteína de vaccinia descrita que adquiere SUMO-1 (Palacios *et al.*, 2005). La delección del gen *A40R* no afecta al tamaño de placa, tasa de crecimiento del virus *in vitro*, título, formación de EV o virulencia en el modelo intranasal (Wilcock *et al.*, 1999). El último gen contenido en dicha delección es *WR208* que codifica una ubiquitina ligasa involucrada en la modulación de la respuesta antiviral (GeneBank, Gene ID: 3707585).

### 3.2. Mutaciones en los genomas de los virus M65 y M101

59 genes en el genoma del virus M65 y 61 genes en el del virus M101 presentaron al menos una mutación de cambio de aminoácido en comparación con la secuencia consenso de WR. Todos los datos referentes a homología de secuencia, número de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP), mutaciones silenciosas o mutaciones de cambio de aminoácido presentes en los genomas de los virus M65 y M101 se encuentran reflejadas en las Tablas 4 y 5. En la Figura 14 se representan las distintas mutaciones observadas en los virus M65 y M101 clasificadas por funciones.



**Figura 14. Representación esquemática de los genomas de los virus mutantes M65 y M101.** Los genes deletados o mutados en los distintos genomas se muestran en cajas. El código de colores corresponde a la función de los distintos genes. El color negro engloba a los genes de rango de hospedador y anquirinas, el color azul a los genes implicados en respuesta inmunológica o interacción con proteínas de la célula huésped; el color marrón incluye los genes relacionados con apoptosis; el color morado engloba los genes del complejo de entrada del virus y el color amarillo representa los genes relacionados con replicación, transcripción o traducción del genoma viral.

Gen	% Secuencia	SNPs	Silenciosas	Cambios
D8L	100	8	1	L21W, H67R, W96L, E105A, K108T, H213Y
F1L	99.85	5	1	Y181C, I208M, T211A, A212V
M1L	100	4	0	H130Q, N131H, F377S
F11L	100	6	2	K327N, R332STOP, R332S
E1L	100	7	2	L10F, N68D, R199L
C1L	100	7	2	K9STOP, K9N, G161E
G9R	100	5	2	V5A, D21N, H192Y
VACWR148	100	6	3	K22E, D317E, C709R
I1L	100	3	1	T114A, A133G
F7L	100	5	0	A15D, L21N
G4L	100	2	0	D21E, A22S
G5R	100	8	4	E124K, N254T
A39R	100	3	1	A96T, T98N
L3L	100	4	2	Q34K, I275T
F13L	100	5	1	A183V, R291K
N1L	100	6	0	D23N, G84C
A27L	100	2	0	A24N, K26E
G8R	100	5	2	A187V
E2L	100	5	1	N690D
E8R	100	1	0	A3G
E9L	100	3	2	H296Y
O1L	100	2	0	P43S
C4L	100	1	0	C48Y
I3L	100	2	0	A157S
I7L	100	10	9	H376Q
I8R	100	1	0	N217D
G3L	100	1	0	G87D
F4L	100	5	3	Y20H
VACWR203	100	2	0	D263N
G6R	100	1	0	C109W

Gen	% Secuencia	SNPs	Silenciosas	Cambios
C5L	34.47	2	1	C71F
F8L	100	6	1	E46K
L1R	100	4	2	K177R
L2R	100	3	0	T5A
K1L	100	1	0	S11A
J5L	100	1	0	L57F
H3L	100	2	1	E112D
H5R	100	2	1	R53G
D1R	100	8	5	S223F
D2L	100	2	1	R125I
K2L	100	2	1	F256S
D11L	100	3	2	T294N
D13L	100	3	1	T183P
A4L	100	1	0	G205D
A11R	100	4	3	Q239R
A14.5L	100	1	0	H47R
A16L	100	1	0	A36T
A20R	100	1	0	F377L
F14.5L	100	1	0	I15L
F17R	100	1	0	C44G
A34R	100	1	0	S45I
K4L	100	1	0	A265S
VACWR192	100	1	0	V67G
B12R	100	1	0	H51Q
VACWR-B15R	100	1	0	E40K
B18R	100	1	0	I293M
B19R	100	3	2	E266D
VACWR201	100	6	0	K37H
VACWR202	100	6	4	T12K

**Tabla 4.** Mutaciones presentes en el virus M65 en comparación con la secuencia del virus WR.

Gen	% Secuencia	SNPs	Silenciosas	Cambio
D8L	100	9	1	Q3R, L21W, H67R, Y104H, N175D, H213N, P222L
F1L	99.85	5	1	Y181C, I208M, T211A, A212V
F11L	100	7	2	L89R, E328D, I329V, R332STOP
C1L	100	8	2	K9STOP, K9N, I93L, G161E
A39R	70.72	5	1	A96T, T98N, K128Q, K128I
M1L	100	4	0	H130Q, N131H, F377S
F13L	100	6	1	D235E, I236L, R291K
E1L	100	8	2	L10F, N68D, R199L
VACWR148	100	7	3	K22E, D317E
G5R	100	8	4	E124K, N254T
I1L	100	3	1	T144A, A133G
I8R	100	2	0	N217D, D296Y
G4L	100	2	0	D21E, A22S
B18R	100	2	0	I293M, K468N
G8R	100	4	1	A187V, N224D
G9R	100	5	2	D21N, H192Y
L3L	100	4	2	Q34K, I275T
J5L	100	2	0	E44G, D90T
H4L	99.96	5	3	Y623C, I624V
H5R	100	3	1	T15A, R53G
K4L	100	2	0	L35V, A265S
A16L	100	2	0	A36T, T320P
N1L	100	6	0	D23N, G84C
A27L	100	3	0	F6S, A25D
E2L	100	7	1	V237A
L2R	100	3	0	T5A
F8L	100	5	1	E46K
C4L	100	1	0	C48Y
K2L	100	2	1	F256S
F16L	100	4	1	V185G

Gen	% Secuencia	SNPs	Silenciosas	Cambio
L1R	100	4	2	K177R
VACWR011	100	1	0	N130Y
F17R	100	1	0	C44S
J2R	100	1	0	H53R
VACWR203	100	2	0	D263N
H1L	100	2	0	A21V
C5L	34.31	2	1	D68Y
E8R	100	1	0	A3G
D1R	100	8	5	S223F
D2L	100	2	1	R125I
E9L	100	3	2	H296Y
A4L	100	1	0	C208R
A11R	100	4	3	Q239R
A14L	100	1	0	L5R
F4L	100	5	3	Y20H
A17L	100	2	0	M34I
A20R	100	1	0	F377L
A24R	100	1	0	A1095T
I3L	100	2	0	A157S
I4L	100	2	1	V468G
A28L	100	3	0	V130G
A34R	100	1	0	STOP169R
I7L	100	10	9	H276Q
A40R	1.46	4	0	K3Q
VACWR169	100	1	0	D70A
A53R	100	1	0	C50W
B2R	100	1	0	A216G
F7L	100	4	0	K21N
B19R	100	3	2	E266D
VACWR201	100	6	0	Y37H
VACWR202	100	6	4	T12K

**Tabla 5.** Mutaciones presentes en el virus M101 en comparación con la secuencia del virus WR.

### 3.2.1. Mutaciones en genes involucrados en la entrada del virus

El gen *D8L* acumula el mayor número de mutaciones de cambio de aminoácido en cada uno de los virus. Presenta 6 mutaciones en el genoma de M65, que provoca los cambios L21W, H67R, W96L, E105A, K108T, H213Y, y 7 en M101 que provoca los cambios Q3R, L21W, H67R, Y104H, N175D, H213N, P222L. Como puede observarse, ambos virus comparten las mutaciones que provocan los cambios L21W y H67R.

El gen *D8L* codifica la proteína D8, que ha sido descrita como proteína de la envuelta viral responsable de unirse a condroitin sulfato en la superficie de las células. La inactivación del gen *D8L* en la cepa parental WR disminuye el tamaño de placa en fibroblastos embrionarios de pollo (CEF), así como la capacidad de propagación del virus en el cerebro de ratón (Chernos *et al.*, 1993).

El gen *A27L*, que codifica una proteína que se une a heparán sulfato e inicia la fusión de membranas (Hsiao *et al.*, 1999), presenta dos mutaciones de cambio de aminoácido distintas en cada virus que provocan los cambios A24N y K26E en el virus M65 y F6S y A25D en el M101.

Los genes *G9R* y *A16L* –en el caso de M101–, son los únicos componentes del complejo de entrada de vaccinia (formado por las proteínas codificadas por los genes *A28L*, *A21L*, *L5R*, *A16L*, *H2R*, *G3L*, *J5R* y *G9R* (Senkevich *et al.*, 2005)) que contienen mutaciones de cambio de aminoácido. El gen *G9R* presenta tres mutaciones de cambio de aminoácido en el genoma de M65 que genera los cambios V5A, D21N, H192Y y D21N, H192Y en la proteína de M101. La mutación presente en el gen *A16L* dentro del genoma de M101 provoca el cambio A36T.

### 3.2.2. Mutaciones en genes involucrados en morfogénesis tardía y tamaño de placa

Seis son las proteínas del virus vaccinia presentes en la forma envuelta del virus o EV: A33, A34, B5, F12 y F13. La delección de cualquiera de sus genes provoca una reducción en el tamaño de placa producido (Earley *et al.*, 2008). De entre todas estas proteínas únicamente A34 y F13 presentaron mutaciones de cambio de aminoácido en el genoma de los virus mutantes.

El genoma del virus M65 contiene una mutación de cambio de aminoácido que provoca el cambio S45I en la proteína A34 (necesaria para un tráfico intracelular eficiente del MV desde el retículo endoplásmico hasta el sitio de envolvimiento (Earley *et al.*, 2008)). La única mutación presente en el virus M101 es una mutación sin sentido (Parada169R).

La proteína F13, codificada por el gen *F13L*, es necesaria para la formación de EV y también juega un papel esencial en la transmisión del virus célula a célula (Blasco & Moss, 1991a). Es necesaria para el envolvimiento de los MVs por cisternas derivadas del trans-Golgi o membranas de endosomas. Se han descrito diferentes mutaciones en *F13L* que disminuyen la producción de EVs en diferentes grados y provocan también una disminución en el tamaño de placa (Roper & Moss, 1999; Honeychurch *et al.*, 2007). Ninguna de las 2 mutaciones presentes en el genoma del virus M65 (que producen los cambios A183V y R291K) o de las 3 presentes en el genoma del virus M101 (que producen los cambios D235E, I236L y R291K), coinciden con las descritas previamente en la literatura (que recaen en los aminoácidos 153 a 156 o producen los cambios K314R o D319E).



Otra proteína descrita como crucial en la formación de virus extracelular y dispersión viral es E2. Dicha proteína presenta una mutación en el genoma del virus M65 (que provoca el cambio N690D) y 2 mutaciones distintas en el genoma de M101 (que provocan los cambios de aminoácido V237A y N690D). A pesar de que no hay información de mutaciones puntuales en el gen *E2L* en la literatura, mutantes que carecen de *E2L* muestran un tamaño de placa reducido y una producción disminuida de EV (Domi *et al.*, 2008).

Alteraciones en genes involucrados en la formación de colas de actina podrían causar un efecto en el tamaño de placa. El gen *F11L* codifica una proteína que inhibe la señalización mediada por RhoA-mDia que facilita la exocitosis dependiente de actina del virus (Arakawa *et al.*, 2007). El virus M65 presenta una mutación de cambio de aminoácido en dicho gen que provoca el cambio K327N, mientras que el genoma del virus M101 acumula tres mutaciones de cambio de aminoácido distintas que generan los siguientes cambios: L89R, E328D y I329V. Ambos virus presentan una mutación sin sentido que genera un codón de parada en el aminoácido 332.

### 3.2.3. Mutaciones presentes en genes involucrados en defensa del hospedador o modulación de la apoptosis

Los genes *C1L*, *N1L*, *M1L* y *F1L*, involucrados en contrarrestar la respuesta antiviral de la célula hospedadora, acumulan también una serie de mutaciones en los dos virus.

El gen *C1L* codifica una proteína hipotética que comparte un dominio BCL-2 presente en proteínas relacionadas con defensa antiviral (Gonzalez & Esteban, 2010). Se han identificado mutaciones que provocan un cambio en la pauta de lectura en ambos virus, además de los siguientes cambios de aminoácido: K9N, G161E, K9Parada, en el genoma del virus M65 y K9Parada, K9N, I93L y G161E en el genoma del M101. Salvo la mutación de cambio en la pauta de lectura o las distintas sin sentido que afectaría a la proteína entera, el resto de mutaciones identificadas no se localizan en los mencionados dominios conservados BCL-2. Sin embargo, el gen *N1L*, otro miembro de la familia BCL-2 descrito como un inhibidor de la apoptosis (Cooray *et al.*, 2007) y de NF kappa B (DiPerna *et al.*, 2004), presenta las mismas dos mutaciones en los dos virus que provocan el cambio D23N, presente en el dominio conservado BCL-2  $\alpha 2$  y G84C presente al final del dominio  $\alpha 5$ . La delección del gen *M1L* es suficiente para atenuar el virus vaccinia (Zhu *et al.*, 2007). En ambos mutantes el gen contiene tres mutaciones sin sentido que producen los cambios: H130Q, N131H y F377S. El gen *B18R* codifica una proteína de unión a interferón tipo I (Colamonici *et al.*, 1995), y presenta una mutación que provoca el cambio I293M en ambos virus y una mutación extra en M101 que produce el cambio L468N.

Además de los genes mencionados, el genoma del virus M65 presenta dos mutaciones de cambio de aminoácido –que provocan los cambios A15D y K21N– en el gen *F7L*, que codifica la 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa, cuya delección causa atenuación del virus vaccinia *in vivo* (Moore & Smith, 1992).

### 3.2.4. Mutaciones en genes involucrados en replicación y transcripción del ADN viral

Ciertas mutaciones de cambio de aminoácido se encontraron en genes involucrados en la síntesis de ADN y en la replicación o transcripción del mismo, la mayoría de ellos localizados en la región central del genoma.

El gen *K4L* que codifica la enzima de corte y unión de vaccinia (Eckert *et al.*, 2005), presenta una mutación en M65 (que produce el cambio A265S) y dos distintas en M101, que provocan los cambios L35V y A265S. El gen *E1L*, que codifica la Polimerasa PAP (Poli-A-Polymerase VP-55 (Gershon, 2004), contiene 3 mutaciones idénticas en ambos virus que provocan los cambios L10F, N68D y R199L. La nucleasa G5 (Da Silva *et al.*, 2006) presenta también mutaciones de cambio de aminoácido idénticas en ambos virus (E124K y N254T). El gen *G8R*, que codifica un ortólogo estructural del antígeno nuclear de proliferación celular (Da Silva & Upton, 2009), presenta una mutación de cambio de aminoácido en el genoma del virus M65 (que provoca el cambio A187V) y dos en M101 (que provocan los cambios A87V y N224D). El gen *I8R*, que codifica las ADN y ARN helicasas (Bayliss & Smith, 1996), contiene una mutación en el genoma del virus M65 (que provoca el cambio N217D) y dos en el genoma de M101 (que provocan los cambios N217D y D296Y). El gen *L3L* codifica un factor de transcripción de genes tempranos (Resch & Moss, 2005), y presenta dos mutaciones en ambos virus (que provoca los cambios Q34K y I275T). El gen *H4L*, que codifica la ARN polimerasa (Mohamed & Niles, 2001), presenta dos mutaciones diferentes en el genoma de M101 (que producen las alteraciones Y623C y I624V).

El factor de transcripción tardío codificado por el gen *H5R* (Kovacs & Moss, 1996) que se fosforila en un residuo de treonina por el complejo B1 (Beaud *et al.*, 1995), mostró una mutación de cambio de aminoácido en ambos mutantes que produjo la alteración R53G y en el caso del M101 una extra que provoca el cambio T15A.

#### ■ 4. Los virus mutantes M65 y M101 recombinantes para la proteína LACK de *Leishmania infantum* son capaces de inducir protección parcial frente a la leishmaniasis cutánea

En estudios previos realizados en el laboratorio se había demostrado que la inmunización basada en una primera dosis con ADN-LACK, seguida de una segunda dosis con WR-LACK, confería protección parcial frente a la leishmaniasis cutánea en el modelo murino (Gonzalo *et al.*, 2002). Posteriormente, mejores resultados de protección e inmunogenicidad fueron obtenidos con la utilización de la cepa atenuada MVA-LACK siguiendo el mismo protocolo (Pérez-Jiménez *et al.*, 2006).

En el presente trabajo quisimos evaluar la capacidad de los virus competentes en replicación M65 y M101 como vectores vacunales frente a la leishmaniasis. Para ello, y previamente a la elaboración de esta tesis, se generaron y purificaron los virus mutantes M65 y M101 que expresaban la proteína LACK de *Leishmania infantum* (M65-LACK y M101-LACK, respectivamente).

El modelo de estudio ha sido la cepa de ratón BALB/c que es altamente susceptible a la leishmaniasis cutánea producida por *L. major* y *L. amazonensis* y que es la misma cepa de ratón utilizada en los estudios realizados con WR-LACK y MVA-LACK.

#### 4.1. Evaluación de la protección obtenida en el modelo de leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania major* tras la inmunización con M65-LACK o M101-LACK

Para evaluar la protección conferida por los distintos mutantes, inmunizamos ratones BALB/c con una dosis por vía intradérmica de ADN-LACK (100µg), seguida de una inoculación intraperitoneal de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de los virus MVA-LACK, M65-LACK o M101-LACK a los 14 días. Tres semanas más tarde (día 35), los animales se desafiaron con una dosis de  $5 \times 10^4$  promastigotes metacíclicos de *L. major*. Se incluyeron como grupos control animales inmunizados con ADN vacío y virus vaccinia parental, así como animales que recibieron dos dosis de PBS.

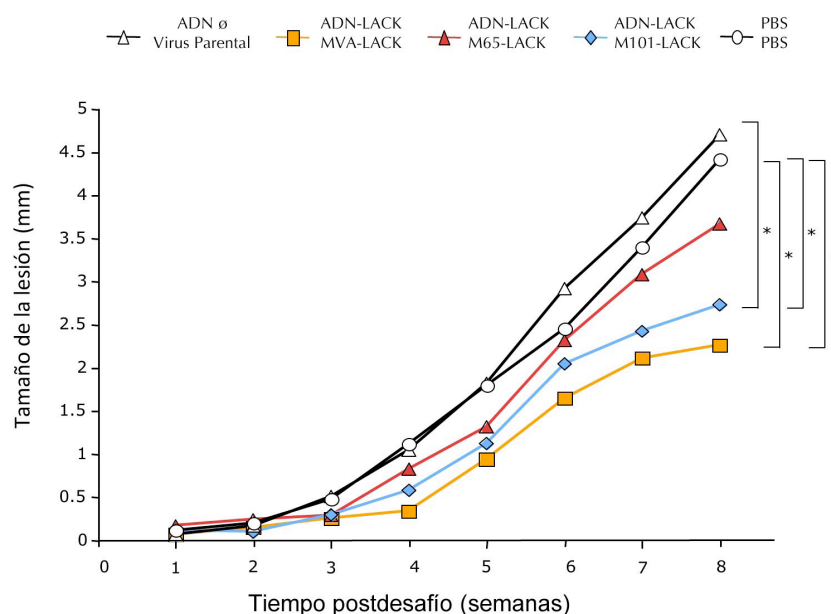
Como se puede observar en la Figura 15, los tres virus recombinantes consiguieron reducir el tamaño de la lesión en diferentes grados. El mayor grado de reducción lo confirió el protocolo ADN-LACK/MVA-LACK con un 51.81 % de reducción en comparación con el grupo control que recibió ADN-vacío/virus parental ( $p=0.032$ ) o un 48.64 % de reducción en comparación con el grupo que recibió dos inoculaciones de PBS ( $p=0.045$ ). Niveles similares de protección fueron obtenidos en los animales vacunados con ADN-LACK/M101-LACK, con una reducción del 42 % respecto al grupo que recibió ADN-vacío/virus parental ( $p=0.01$ ) y un 38.18 % con respecto al grupo que recibió dos dosis de PBS ( $p=0.018$ ). Reducciones no significativas del 20 % (respecto al grupo que recibió ADN-vacío/virus parental) o del 17 % (respecto al grupo que recibió dos dosis de PBS) fueron observadas en el grupo vacunado con la combinación ADN-LACK/M65-LACK.

La falta de protección obtenida en el grupo de animales vacunado con el virus de mayor capacidad replicativa (M65-LACK) nos llevó a cuestionarnos si era posible que el mantener la replicación durante más tiempo pudiera interferir con el desafío con el parásito si éste se realizaba muy próximo al tiempo en el que se administraba el virus. Por esta razón decidimos ampliar de 3 a 8 semanas el tiempo entre la dosis de virus y el desafío con *L. major*, punto que coincidía con el estudio de la memoria inmunológica producida por la vacunación.

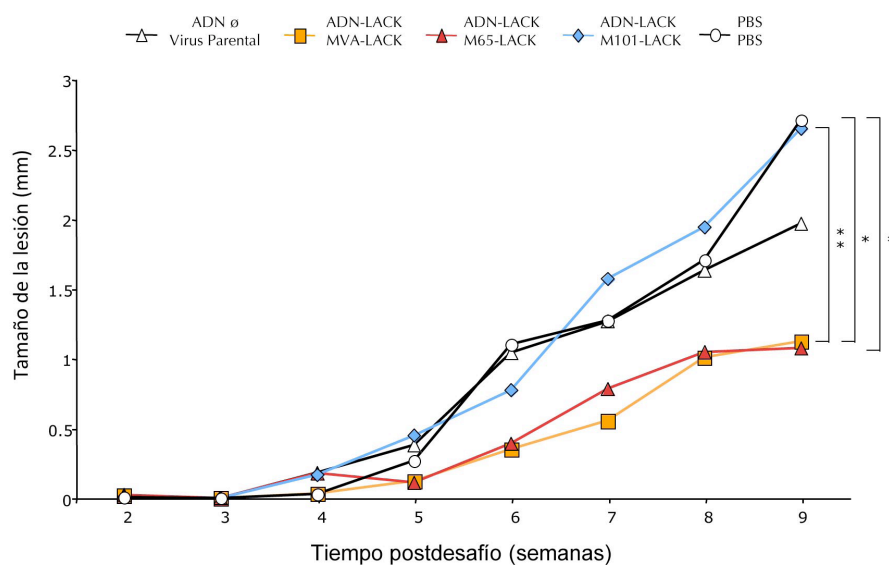
Utilizando esta nueva aproximación, y como puede observarse en la Figura 16, se obtuvo un 59.39 % de reducción en el tamaño de la lesión en el grupo que recibió ADN-LACK/M65-LACK en comparación con los inoculados con dos dosis de PBS ( $p=0.043$ ), y un 60.19 % de reducción en comparación con el grupo que recibió ADN-LACK/M101-LACK ( $p=0.011$ ) que no confirió protección alguna. Cabe señalar que en el grupo que recibió ADN-LACK/M65-LACK, 2 de los 6 animales resolvieron la inflamación inicial tras el desafío y no desarrollaron lesión en ningún grado (dato no mostrado).

#### 4.2. Evaluación de la protección obtenida en el modelo de leishmaniosis cutánea producida por *Leishmania amazonensis*

Con el objetivo de reforzar los datos de protección obtenidos, decidimos estudiar la capacidad protectora del protocolo de inmunización heterólogo en otros modelos experimentales de leishmaniasis cutánea, como es el ejemplo de *Leishmania amazonensis*.



**Figura 15. Evaluación de la protección conferida por los virus recombinantes M65-LACK y M101-LACK frente a *L. major*.** Ratones BALB/c ( $n=6$ ), de 6–8 semanas de edad, fueron inmunizados por ruta intradérmica (i.d.) en el abdomen con 100  $\mu\text{g}$  de ADN-LACK o ADN-vacío en 100  $\mu\text{l}$  por ratón. A día 14 los ratones recibieron una dosis intraperitoneal (i.p.) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de M65-LACK, M101-LACK, MVA-LACK, virus vaccinia parental o PBS. A día 35 los animales fueron desafiados con una dosis de  $5 \times 10^4$  promastigotes metacíclicos de *L. major*. En la gráfica se muestra el desarrollo de la lesión medida semanalmente tras el desafío. (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ).

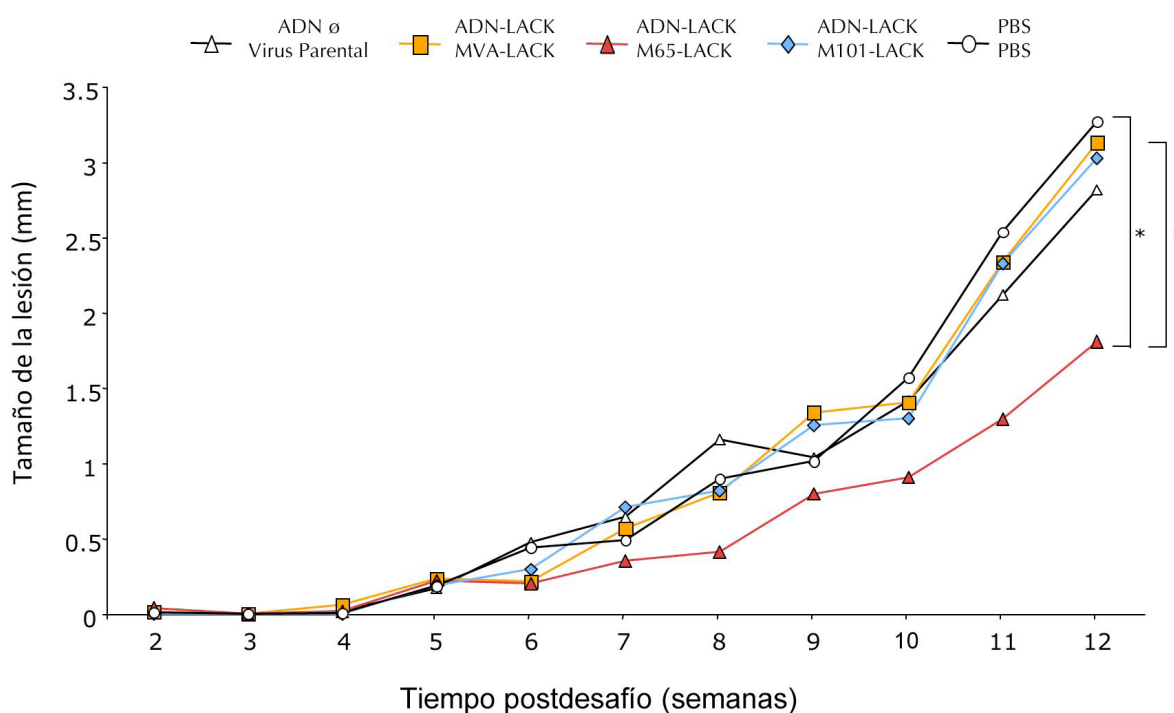


**Figura 16. Evaluación de la protección conferida por los virus recombinantes M65-LACK y M101-LACK frente a *L. major*.** Ratones BALB/c ( $n=6$ ), de 6–8 semanas de edad, fueron inmunizados por ruta intradérmica (i.d.) en el abdomen con 100  $\mu\text{g}$  de ADN-LACK o ADN-vacío en 100  $\mu\text{l}$  por ratón. A día 14 los ratones recibieron una dosis intraperitoneal (i.p.) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de M65-LACK, M101-LACK, MVA-LACK, virus Vaccinia parental o PBS. A día 67 los animales fueron desafiados con una dosis de  $5 \times 10^4$  promastigotes metacíclicos de *L. major*. En la gráfica se muestra el desarrollo de la lesión medida semanalmente tras el desafío. (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ).

Con este propósito, inmunizamos ratones BALB/c con una dosis intradérmica de 100µg de ADN-LACK, seguida de una inoculación intraperitoneal de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de los virus MVA-LACK, M65-LACK o M101-LACK a los 14 días.

Se incluyeron como grupos control animales inmunizados con ADN-vacío y virus vacinia parental, así como animales que recibieron dos dosis de PBS. Pasadas ocho semanas de la inoculación con los distintos virus (día 67), los animales fueron desafiados con  $2 \times 10^4$  promastigotes estacionarios de *L. amazonensis* en la almohadilla plantar.

Como se muestra en la Figura 17, la combinación de ADN-LACK/M65-LACK retrasó el desarrollo de las lesiones, observándose en los animales de este grupo un 44.75 % de reducción en el tamaño de la lesión en comparación con animales que recibieron dos dosis de PBS ( $p=0.02$ ), un 35.86 % en comparación con el grupo que recibió ADN-vacío y virus parental ( $p=0.08$ ) y un 40.29 % de reducción respecto a los animales que recibieron ADN-LACK/M101-LACK ( $p=0.04$ ).



**Figura 17. Evaluación de la protección conferida por los virus recombinantes M65-LACK y M101-LACK frente a *L. amazonensis*.** Ratones BALB/c ( $n=6$ ), de 6–8 semanas de edad, fueron inmunizados por ruta intradérmica (i.d.) en el abdomen con 100 µg de ADN-LACK o ADN-vacío en 100 µl por ratón. A día 14 los ratones recibieron una dosis intraperitoneal (i.p.) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de M65-LACK, M101-LACK, MVA-LACK, virus vaccinia parental o PBS. Ocho semanas después de la inoculación con los distintos virus (día 67), los animales fueron desafiados con una dosis de  $2 \times 10^4$  promastigotes metacíclicos de *L. amazonensis*. En la gráfica se muestra el desarrollo de la lesión medida semanalmente tras el desafío. (\*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.005$ ; \*\*\*  $p<0.0005$ ).



## ■ 5. Caracterización de las poblaciones celulares inducidas por el protocolo de vacunación heterólogo con ADN y los mutantes M65 y M101 recombinantes para el antígeno LACK de *Leishmania infantum*

La utilización de protocolos de inmunización que combinan una primera dosis de ADN y una segunda dosis con un poxvirus recombinante que expresan el mismo antígeno, ha demostrado ser una estrategia muy eficaz para la activación de una respuesta celular en numerosos modelos animales (Zavala *et al.*, 2001; McConkey *et al.*, 2003; Ramsburg *et al.*, 2004; Mooij *et al.*, 2008; Nájera *et al.*, 2010).

En el laboratorio se describió que este protocolo de vacunación, utilizando la cepa atenuada del virus vaccinia MVA, era capaz de estimular una respuesta celular de tipo Th1, que es crucial en el desarrollo de resistencia frente a la infección por *L. major*.

La respuesta celular, en particular las respuestas T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, tienen un papel central en el control de infecciones ante un amplio rango de patógenos. En el caso de la leishmaniasis, varios estudios han sido diseñados para diseccionar la relevancia de estas poblaciones celulares en la infección natural, profilaxis o terapia.

Con estos antecedentes, decidimos estudiar la respuesta inmunológica celular adaptativa y de memoria inducida en ratones BALB/c por los virus recombinantes siguiendo un protocolo de vacunación heterólogo con ADN-LACK como primera dosis, seguido de una inoculación de M65-LACK o M101-LACK en comparación con MVA-LACK como segunda dosis. También decidimos evaluar el efecto de la infección experimental con promastigotes metacíclicos de *L. major* en la respuesta inmunológica inducida por la vacunación.

### 5.1. Caracterización de la respuesta inmunológica celular adaptativa

Para analizar en detalle la respuesta inmunológica celular adaptativa inducida por los virus recombinantes, ratones BALB/c (4 animales por grupo), de 6 a 8 semanas de edad, fueron inmunizados por ruta intradérmica (i.d) en el abdomen con 100 µg de ADN-LACK o ADN-vacío en 100 µl de agua inyectable. A día 14 los ratones recibieron una dosis intraperitoneal (i.p) con 2x10<sup>7</sup> ufp/ratón de los virus M65-LACK, M101-LACK, MVA-LACK o vaccinia parental como control.

Los animales fueron sacrificados 11 días después de la dosis recuerdo y se evaluó la respuesta inmunológica adaptativa en esplenocitos aislados de los ratones inmunizados y estimulados *in vitro* con la proteína LACK purificada, el péptido LACK<sub>157-173</sub> o con células presentadoras de antígeno A20 nucleofectadas con el plásmido de expresión eucariota pCIneo-LACK.

Para estudiar en primer lugar la contribución global de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas para el antígeno LACK, se determinó la magnitud de la respuesta como la suma de las frecuencias de células productoras de IFNγ, TNFα y/o IL-2. Como se puede observar en

la Figura 18A, el protocolo de vacunación heterólogo con el virus MVA-LACK indujo una marcada respuesta T CD8<sup>+</sup> frente al antígeno LACK, mientras que las respuestas inducidas por los virus mutantes fueron más equilibradas, con una contribución similar por parte de las poblaciones T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, si bien la magnitud de ambas respuestas fue mayor en el caso de los animales inmunizados con el mutante M101-LACK.

La medición simultánea de tres citoquinas permite el análisis de la calidad de la respuesta inmunológica producida. Al evaluar la producción de tres citoquinas (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2), siete poblaciones distintas de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> fueron identificadas. Como se muestra en la Figura 18B, el protocolo de vacunación heterólogo con los tres virus indujo un perfil de respuesta similar, consistente en su mayoría en células T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$ , así como dobles productoras de IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ , aunque la magnitud de la respuesta T CD8<sup>+</sup> está claramente disminuida en el grupo de animales inmunizado con el virus M65-LACK.

La respuesta de células T CD4<sup>+</sup> frente al antígeno LACK (Figura 18C) mostró una alta polifuncionalidad, representada en su mayoría por células que producían al mismo tiempo las tres citoquinas estudiadas (39 % en el caso de los ratones inmunizados con MVA-LACK, 64 % en los inmunizados con M65-LACK y 49 % en el caso de M101-LACK), siendo las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> doble secretoras de IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ /IL-2 las más representadas. El mismo patrón de polifuncionalidad fue observado cuando los esplenocitos fueron reestimulados con el péptido CD4 LACK<sub>157-173</sub> (Figura 18D).

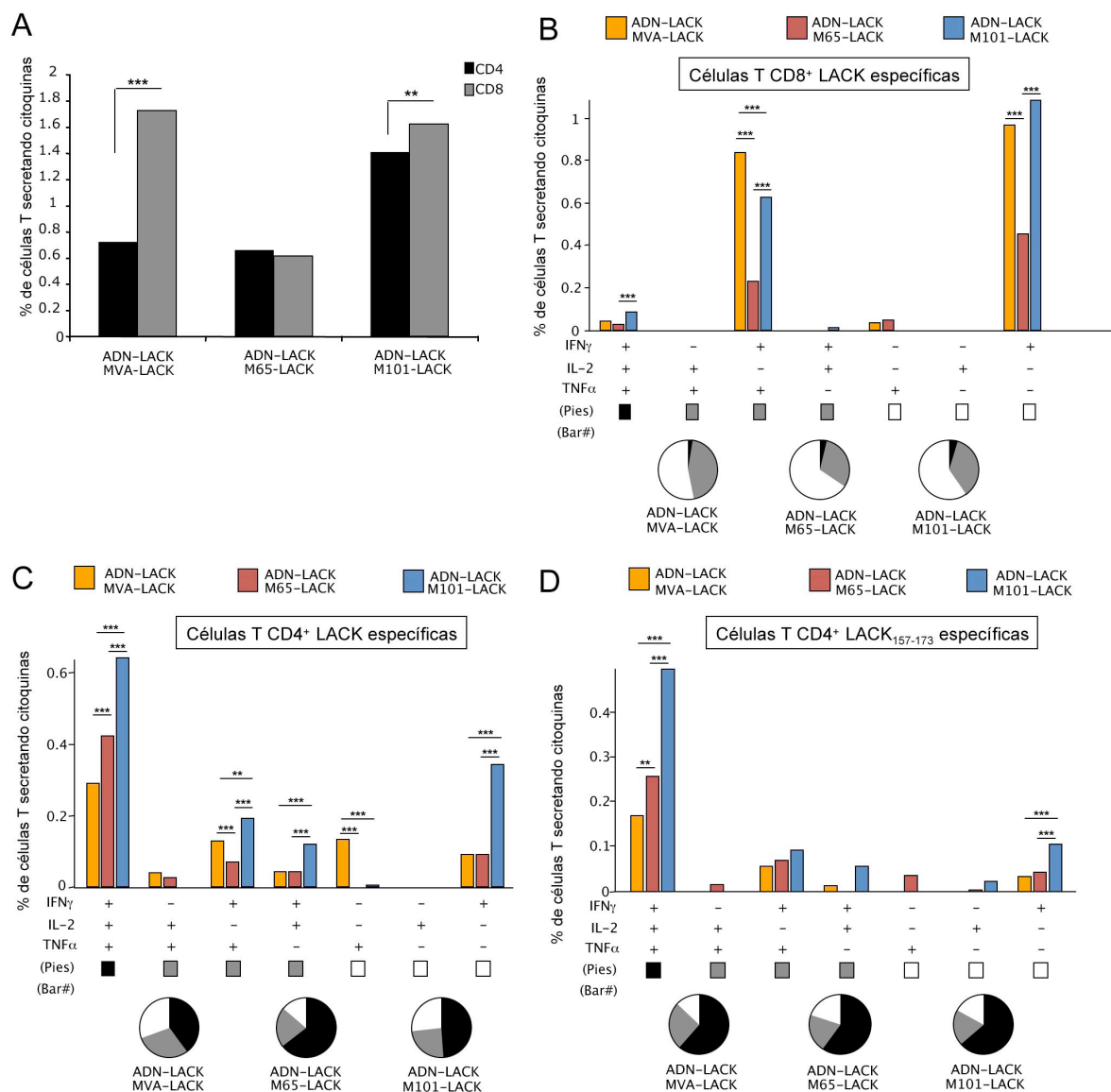
La magnitud y polifuncionalidad de la respuesta antígeno-específica de células T CD8<sup>+</sup> se potenció significativamente cuando se empleó como fuente de presentación antigénica células A20 nucleofectadas con el plásmido pCINeo-LACK (Figura 19), en comparación con el uso de la proteína LACK purificada (Figura 18B) aunque las poblaciones celulares estimuladas fueran las mismas en ambos casos.

Además de la producción de citoquinas, decidimos evaluar la actividad citotóxica antígeno-específica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Para ello determinamos la expresión de CD107a sobre la superficie de las células T activadas, que ocurre como resultado de la degranulación (Betts *et al.*, 2003).

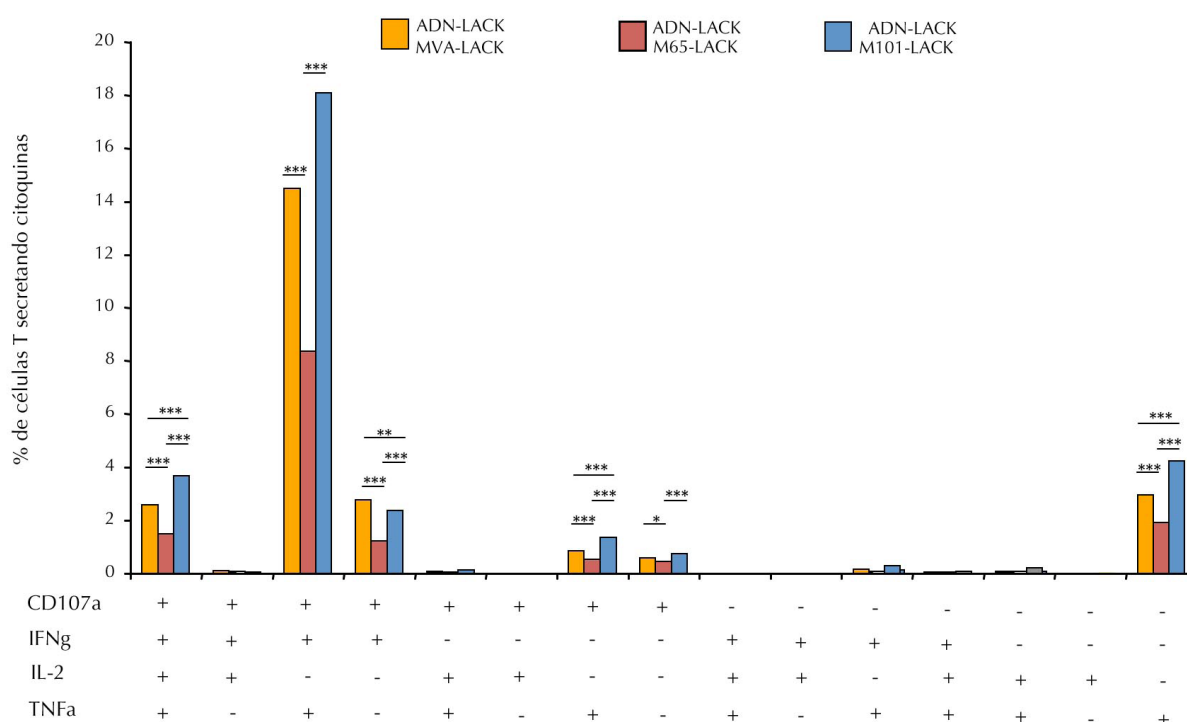
Como puede observarse en la Figura 19, la magnitud de la capacidad degranulativa sigue el mismo patrón que la magnitud de la producción de citoquinas por parte de los linfocitos de animales inmunizados con los distintos virus. Es de marcada importancia que en todos los animales inmunizados, los mayores niveles de degranulación fueron detectados en células dobles secretoras de IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ , que son las células T CD8<sup>+</sup> principalmente inducidas por este protocolo de inmunización.

Tomando todos los datos en conjunto, podemos afirmar que los virus mutantes M65-LACK y M101-LACK producen una respuesta adaptativa polifuncional mediada por células T, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. En la respuesta T CD8<sup>+</sup>, la población celular más representada fue la doble productora de IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  que además posee una alta capacidad citotóxica (medida como la capacidad de degranulación). La magnitud de esta respuesta fue similar en los grupos inmunizados con MVA-LACK y M101-LACK y claramente inferior en animales inmunizados con el virus M65-LACK. Los animales inmunizados con el virus M101-LACK también mostraron una magnitud mayor de respuesta antígeno específica mediada por células T CD4<sup>+</sup>, con un perfil de polifuncionalidad amplio, representado en su mayoría por células triple secretoras, sobre todo en el caso de los animales inmunizados con el M65-LACK que poseían un porcentaje más elevado de esta población celular.





**Figura 18. Caracterización de la respuesta inmunológica celular adaptativa.** A. Análisis de la magnitud total de la respuesta T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en esplenocitos estimulados con la proteína LACK. Entre la población de linfocitos, las células T fueron seleccionadas y la producción de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 fue analizada. Los niveles de fondo del grupo inmunizado con el virus parental fueron sustraídos antes de la representación. La producción de citoquinas por parte de las células T CD8<sup>+</sup> LACK-específicas (B), células T CD4<sup>+</sup> LACK-específicas (C) o células T CD4<sup>+</sup> LACK<sub>157-173</sub>-específicas (D) se representa en los distintos paneles. Las diferentes combinaciones de citoquinas se indican en el eje x, mientras que los porcentajes de células T productoras de citoquinas se indican en el eje y. Los círculos muestran la calidad de la respuesta, medida como la cantidad relativa de células productoras de una, dos o tres citoquinas simultáneamente. (\* p<0.05; \*\* p<0.005; \*\*\* p<0.0005).



**Figura 19. Caracterización de la respuesta inmunológica de los linfocitos T CD8+ en esplenocitos estimulados con células A20 nucleofectadas con el plásmido pCIneo-LACK.** Entre la población de linfocitos, las células T CD8+ fueron seleccionadas y la producción de CD107a, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 fue analizada. Los niveles de fondo del grupo inmunizado con el virus control fueron sustraídos antes de la representación. Las diferentes combinaciones de citoquinas se indican en el eje x, mientras que los porcentajes de células T productoras de citoquinas se indican en el eje y. (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ).

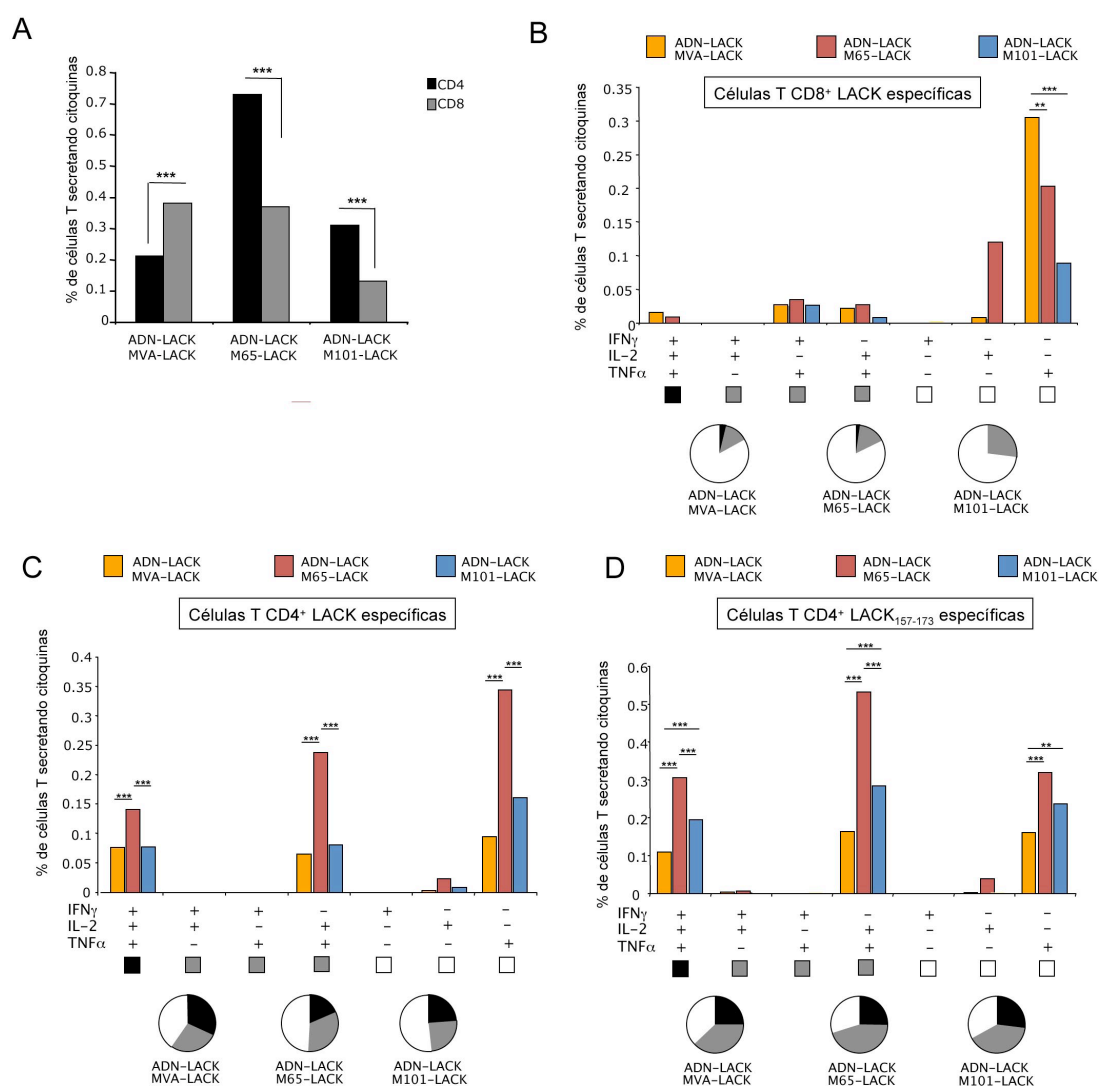
## 5.2. Caracterización de la respuesta inmunológica celular de memoria

Para analizar en detalle la respuesta celular de memoria inducida por los virus recombinantes, ratones BALB/c (4 animales por grupo), de 6 a 8 semanas de edad, fueron inmunizados por ruta intradérmica (i.d) en el abdomen con 100  $\mu$ g por ratón de ADN-LACK o ADN-vacío en 100  $\mu$ l de agua para inyectables. A día 14 los ratones recibieron una dosis intraperitoneal (i.p) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de los virus M65-LACK, M101-LACK, MVA-LACK o vaccinia parental como control.

53 días después de la segunda dosis (día 67), los animales fueron sacrificados y se evaluó la respuesta inmunológica de memoria en esplenocitos estimulados *in vitro* con la proteína LACK purificada, el péptido LACK<sub>157-173</sub> o con células presentadoras de antígeno A20, nucleofectadas con el plásmido de expresión eucariota pCIneo-LACK.

Decidimos determinar en primer lugar, como hicimos en la caracterización de la respuesta inmunológica adaptativa, la contribución global de las células T CD4+ y CD8+ específicas para el antígeno LACK, analizando para ello la suma de las frecuencias de células productoras de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y/o IL-2.

Como se puede observar en la Figura 20A, el balance entre células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> en esplenocitos reestimulados con la proteína LACK seguía mostrando un mayor porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> respecto a CD4<sup>+</sup> en el grupo de animales inmunizados con el virus MVA-LACK, mientras que en el caso de los animales inmunizados con el mutante M65-LACK existía un claro aumento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> LACK-específicos. Un comportamiento similar fue observado en los ratones inmunizados con el virus M101-LACK, aunque la magnitud era inferior que el caso de los ratones inmunizados con el virus M65-LACK.

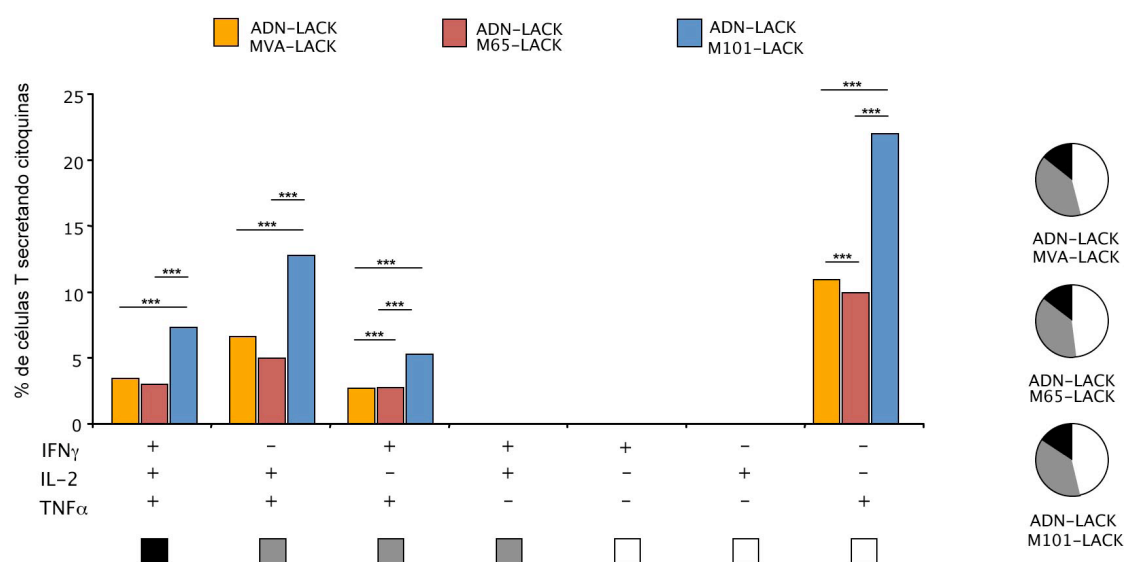


**Figura 20. Caracterización de la respuesta inmunológica celular de memoria.** A. Análisis de la magnitud total de la respuesta T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en esplenocitos estimulados con la proteína LACK a 53 días después de la segunda dosis. Entre la población de linfocitos, las células T fueron seleccionadas y la producción de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 fue analizada. Los porcentajes de células T secretoras de citoquinas obtenidas en el grupo inmunizado con el virus parental fueron sustraídos antes de la representación. La producción de citoquinas por parte de células T CD8<sup>+</sup> LACK-específicas (B), células T CD4<sup>+</sup> LACK-específicas (C), o células T CD4<sup>+</sup> LACK<sub>157-173</sub>-específicas (D), se representa en los distintos paneles. Las diferentes combinaciones de citoquinas se indican en el eje x, mientras que los porcentajes de células T productoras de citoquinas se indican en el eje y. Los círculos muestran el perfil de polifuncionalidad de la respuesta, medida como la cantidad relativa de células productoras de una, dos o tres citoquinas simultáneamente. (\* p<0.05; \*\* p<0.005; \*\*\* p<0.0005).

Posteriormente, evaluamos el perfil de polifuncionalidad de la respuesta T antígeno-específica en las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Como se muestra en la Figura 20B, la respuesta T CD8<sup>+</sup> en esplenocitos reestimulados con la proteína LACK estaba mayoritariamente representada por células secretoras de TNF $\alpha$ , presentando una mayor magnitud en los animales inmunizados con el virus MVA-LACK.

La respuesta de células T CD4<sup>+</sup> frente al antígeno LACK (Figura 20C) mostró una marcada polifuncionalidad en los esplenocitos aislados de animales inmunizados con los tres virus, representada por células que producían al mismo tiempo las tres citoquinas (32,1 % en el caso de los ratones inmunizados con MVA-LACK, 18,9 % en los inmunizados con M65-LACK y 23,6 % en el caso de los ratones inmunizados con M101-LACK), poblaciones de células dobles productoras de citoquinas, dónde las más representadas eran las que secretaban TNF $\alpha$ /IL-2 (aproximadamente el 30 % de las poblaciones estimuladas en los animales inmunizados con los tres virus) y por células simples productoras de TNF $\alpha$ , que alcanzaron el 50 % de la respuesta total T CD4<sup>+</sup>. El mismo patrón fue observado cuando los esplenocitos fueron reestimulados con el péptido CD4<sup>+</sup> LACK<sub>157-173</sub> (Figura 20D).

Como observamos con anterioridad, la presentación del antígeno LACK por parte de células presentadoras A20 nucleofectadas con el plásmido pCIneo-LACK fue más eficiente, detectándose una magnitud superior de células T CD8<sup>+</sup> a la obtenida con esplenocitos reestimulados directamente con la proteína y de una mayor polifuncionalidad. Como puede observarse en la Figura 21, la población más representada fueron células T CD8<sup>+</sup> simples productoras de TNF $\alpha$  (alrededor del 50 % de la población de células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas).

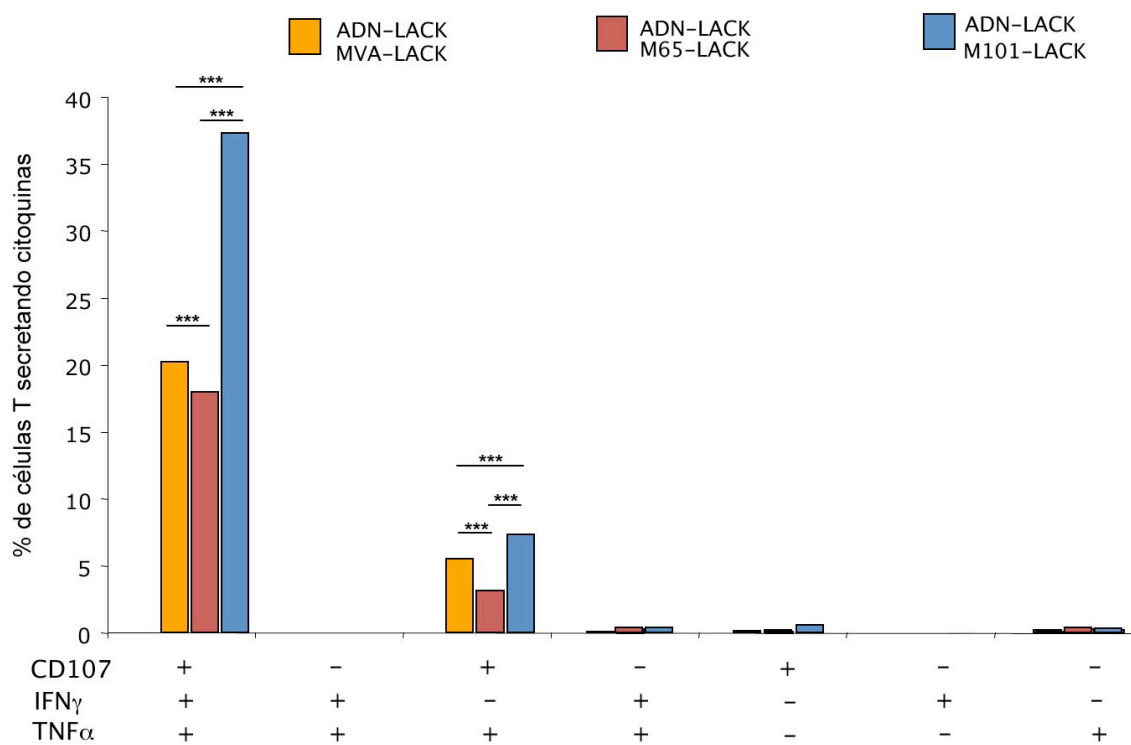


**Figura 21. Caracterización de la respuesta inmunológica celular de memoria en esplenocitos estimulados con células A20 nucleofectadas con el plásmido pCIneo-LACK.** Entre la población de linfocitos, las células T CD8<sup>+</sup> fueron seleccionadas y la producción de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 fue analizada. Los porcentajes de células T secretoras de citoquinas del grupo inmunizado con el virus parental fueron sustraídos antes de la representación. Las diferentes combinaciones de citoquinas se indican en el eje x, mientras que los porcentajes de células T productoras de citoquinas se indican en el eje y. Los círculos muestran el perfil polifuncional de la respuesta, medida como la cantidad relativa de células productoras de una, dos o tres citoquinas simultáneamente. (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ).

También caracterizamos en esta etapa de la respuesta inmunológica la capacidad citotóxica de los linfocitos T antígeno-específicos. Como se observa en la Figura 22, la actividad citotóxica se ejerce en su mayoría por células dobles positivas  $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ , dato que concuerda con lo observado en las poblaciones estimuladas en la respuesta adaptativa.

A continuación, decidimos caracterizar el fenotipo de las células T de memoria utilizando los marcadores CD62L y CD44, que nos permiten diferenciar entre células T efectoras ( $\text{CD62L}^+ \text{CD44}^-$ ), células T centrales de memoria ( $\text{CD62L}^+ \text{CD44}^+$ ) y células T naïve ( $\text{CD62L}^- \text{CD44}^+$ ).

En los distintos grupos estudiados observamos que los linfocitos T LACK específicos, tanto las poblaciones T  $\text{CD4}^+$  como T  $\text{CD8}^+$  eran fundamentalmente efectoras. Dichos marcadores no permiten discriminar si dichas poblaciones efectoras son simplemente linfocitos efectores o linfocitos de memoria efectores, así que decidimos utilizar los marcadores CD62L y CD127, que nos permiten diferenciar entre células efectoras ( $\text{CD62L}^- \text{CD127}^-$ ) y células efectoras de memoria ( $\text{CD62L}^- \text{CD127}^+$ ).

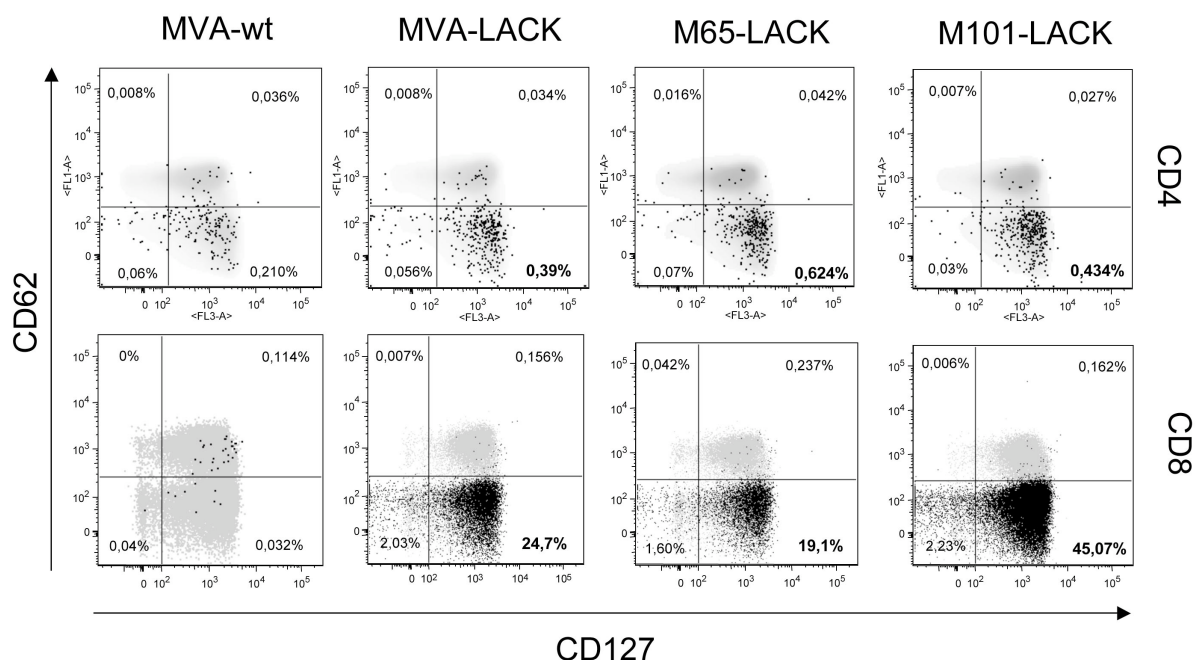


**Figura 22. Caracterización de la capacidad citotóxica de las células T  $\text{CD8}^+$  de memoria en esplenocitos estimulados con células A20 nucleofectadas con el plásmido pCIneo-LACK.** Entre la población de linfocitos, las células T  $\text{CD8}^+$  fueron seleccionadas y la producción de CD107a,  $\text{IFN}\gamma$  y  $\text{TNF}\alpha$  fue analizada. Los porcentajes de células T secretoras de citoquinas del grupo inmunizado con el virus parental fueron sustraídos antes de la representación. Las diferentes combinaciones de citoquinas se indican en el eje x, mientras que los porcentajes de células T productoras de citoquinas se indican en el eje y. (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ).

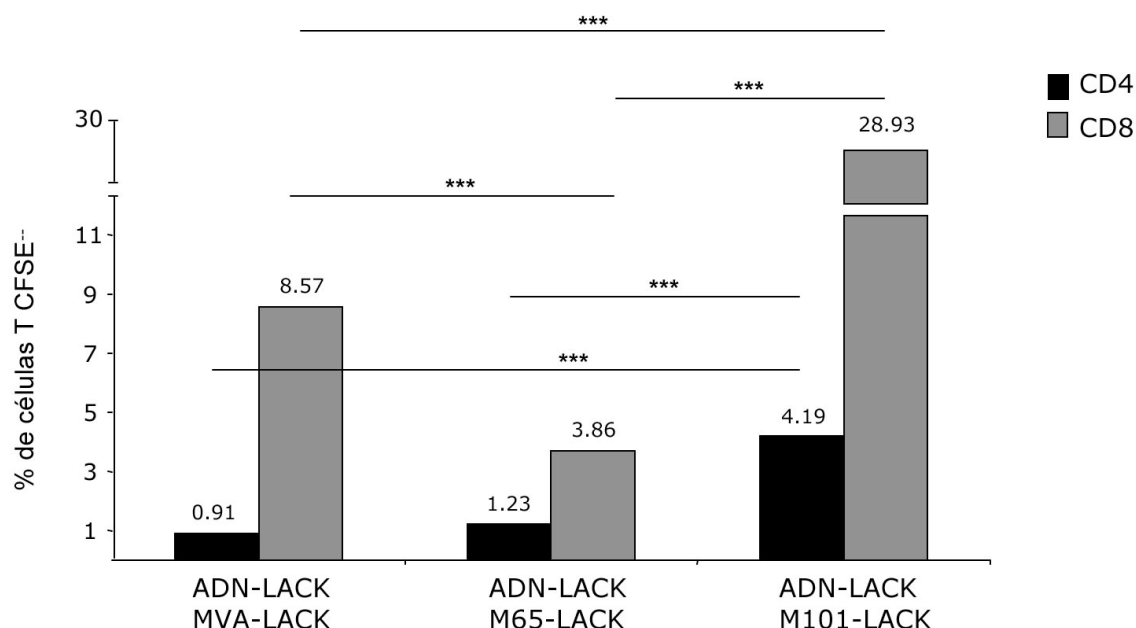
Como se puede observar en la Figura 23, el fenotipo de los linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  de memoria era claramente efecto de memoria, o  $CD62L^+CD127^+$ .

Por último, decidimos evaluar la capacidad proliferativa de las distintas poblaciones de linfocitos, marcando los esplenocitos procedentes de animales inmunizados con el reactivo CFSE y estimulados con la proteína LACK durante 6 días. La capacidad proliferativa se determinó como el porcentaje de células T antígeno-específicas que había perdido la marca del reactivo CFSE. Como se muestra en la Figura 24, se produjo una mayor proliferación de linfocitos T  $CD8^+$  respecto a los linfocitos T  $CD4^+$ . El grupo que mostró una mayor proliferación de ambas poblaciones fue el correspondiente a los esplenocitos extraídos de animales inmunizados con el virus M101-LACK (28.93 % de células T  $CD8^+$  y 4.19% de células T  $CD4^+$ ). Los esplenocitos de animales inmunizados con el virus M65-LACK mostraron una capacidad de proliferación más limitada con una frecuencia de células T  $CD8^+$  de 3.86 % y 1.23 % de células T  $CD4^+$  proliferando. En esplenocitos de animales inmunizados con el virus MVA-LACK el porcentaje de células T  $CD8^+$  con capacidad proliferativa fue intermedio (8.57%) mientras que el de células T  $CD4^+$  fue el más bajo de entre los tres virus (0.91 %).

Tomando todos los datos en conjunto, podemos afirmar que los virus mutantes M65-LACK y M101-LACK inducen una respuesta de memoria mediada tanto por células T  $CD4^+$  como por células T  $CD8^+$  con un perfil altamente polifuncional y un fenotipo efector de memoria con capacidad proliferativa.



**Figura 23. Fenotipo de las poblaciones de células T de memoria inducidas por el protocolo de inmunización heterólogo.** Entre la población de linfocitos, las células T  $CD8^+$  y T  $CD4^+$  fueron seleccionadas y la producción de  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  e IL-2 fue analizada. En el gráfico se muestran los porcentajes de células T antígeno-específicas con fenotipo de células T centrales de memoria ( $CD62L^+CD127^+$ ), células T efectoras ( $CD62L^-CD127^-$ ) y células T efectoras de memoria ( $CD62L^+CD127^-$ ).



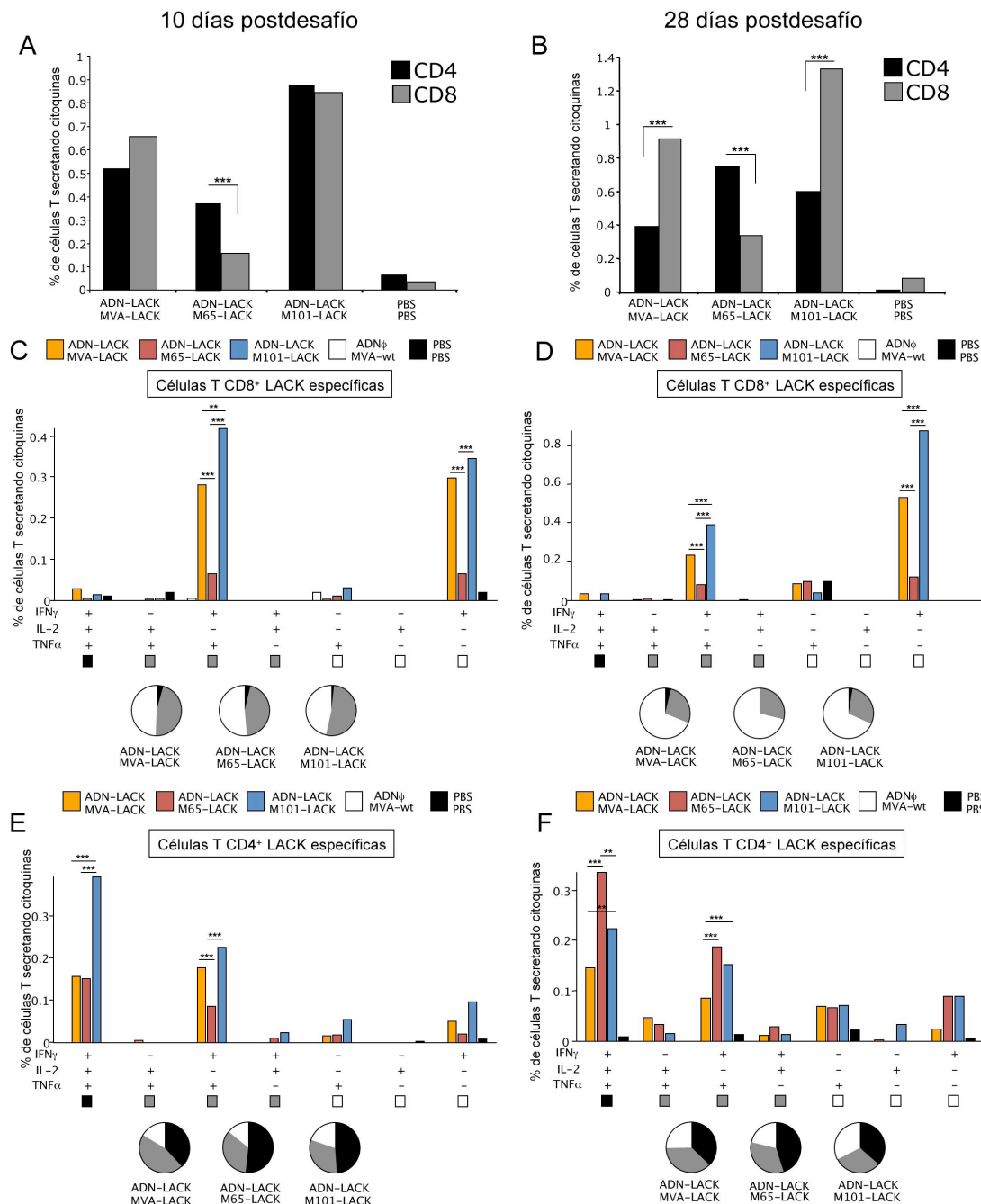
**Figura 24. Evaluación de la tasa de proliferación de poblaciones de células T de memoria inducidas por el protocolo de inmunización heterólogo.** Entre la población de linfocitos, las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> fueron seleccionadas y la pérdida del marcador CFSE fue analizada. En el gráfico se muestran los distintos porcentajes de células T que proliferaron durante 6 días en presencia de la proteína LACK. (\* p<0.05; \*\* p<0.005; \*\*\* p<0.0005).

### 5.3. Caracterización de las poblaciones celulares inducidas en etapas tempranas tras el desafío con promastigotes metacíclicos de *L. major*

Para caracterizar en mayor profundidad la respuesta inmunológica generada por nuestro protocolo heterólogo de inmunización utilizando los mutantes M65-LACK y M101-LACK, decidimos estudiar el efecto de la infección experimental por el parásito sobre las poblaciones celulares inducidas tras la vacunación con los distintos virus recombinantes.

Para ello, ratones BALB/c (4 animales por grupo), de 6 a 8 semanas de edad, fueron inmunizados por ruta intradérmica (i.d) en el abdomen con 100 µg por ratón de ADN-LACK o ADN-vacío en 100 µl de agua para inyectables. A día 14, los ratones recibieron una dosis intraperitoneal (i.p) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de los virus M65-LACK, M101-LACK, MVA-LACK o vaccinia parental como control. Tres semanas después de recibir la dosis de virus (día 35), los animales fueron desafiados con  $5 \times 10^4$  promastigotes metacíclicos de *L. major*. Los animales fueron sacrificados en dos puntos distintos: 10 días tras el desafío (día 45) –para estudiar el impacto inicial de la infección por el parásito– y 28 días tras el desafío (día 63) –momento en el que los animales resuelven la infección inicial o comienzan a desarrollar úlceras cutáneas–.





**Figura 25. Caracterización del impacto de la infección con *Leishmania major* sobre la respuesta inmunológica en animales vacunados.** Análisis de la magnitud total de la respuesta T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en esplenocitos estimulados con la proteína LACK 10 días postdesafío (A, C, E) y 28 días postdesafío (B, D, F). Entre la población de linfocitos, las células T fueron seleccionadas y la producción de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 fue analizada. Los porcentajes de células T secretoras de citoquinas del grupo control inmunizado con el virus parental fueron sustraídos antes de la representación. La producción de citoquinas por parte de células T CD8<sup>+</sup> LACK-específicas 10 días postdesafío (C), y 28 días postdesafío (D) fue evaluada así como la producción de citoquinas por parte de células T CD4<sup>+</sup> LACK-específicas 10 días postdesafío (E) o 28 días postdesafío (F). Las diferentes combinaciones de citoquinas se indican en el eje x, mientras que los porcentajes de células T productoras de citoquinas se indican en el eje y. Los círculos muestran polifuncionalidad de la respuesta, medida como la cantidad relativa de células productoras de una, dos o tres citoquinas simultáneamente. (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ).

A 10 días postdesafío, apenas pudimos observar diferencias en la respuesta inmunológica previamente generada y analizada en el punto de respuesta inmunológica adaptativa. Se observó un incremento en las frecuencias de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos para la proteína LACK en los distintos grupos de animales inmunizados, siendo más pronunciado en los grupos inmunizados con MVA-LACK y M65-LACK. Tampoco se observaron cambios en el perfil de respuesta, que seguía representado por células T CD8<sup>+</sup> secretoras de IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  o simples secretoras de IFN $\gamma$  y por células T CD4<sup>+</sup> triple productoras de citoquinas (Figura 25A,C y E).

A 28 días postdesafío, sí se observaron diferencias en el patrón de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas para el antígeno LACK entre los esplenocitos de animales inmunizados con los distintos virus. En el grupo de los animales vacunados con el virus M65-LACK se mantuvo una mayor magnitud de células T CD4<sup>+</sup> frente a CD8<sup>+</sup>, mientras que en los grupos de animales vacunados con MVA-LACK y M101-LACK se observó un claro incremento de la respuesta T CD8<sup>+</sup>, como se ilustra en la Figura 25B.

A este tiempo también observamos una disminución de la polifuncionalidad de la respuesta de células T CD8<sup>+</sup>, debido a un descenso en la población de células T doble positivas IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  y un aumento de las células T simples secretoras de IFN $\gamma$ .

#### 5.4. Caracterización de las poblaciones celulares inducidas en etapas tardías tras el desafío con promastigotes metacíclicos de *L. major*

Con el objetivo de entender si estos cambios en las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas para el antígeno LACK estaban relacionadas con la protección obtenida, decidimos realizar unos estudios preliminares en los animales vacunados y desafiados con 5x10<sup>4</sup> promastigotes metacíclicos a 8 semanas postvacunación (día 67), cuya progresión de lesión se mostraba en la Figura 16 de la página 84 de Resultados. En dicha inmunización la mitad de los animales vacunados con la combinación ADN-LACK/MVA-LACK así como una tercera parte de los animales vacunados con la combinación ADN-LACK/M65-LACK resultaron completamente protegidos y no desarrollaron lesión tras la infección con el parásito.

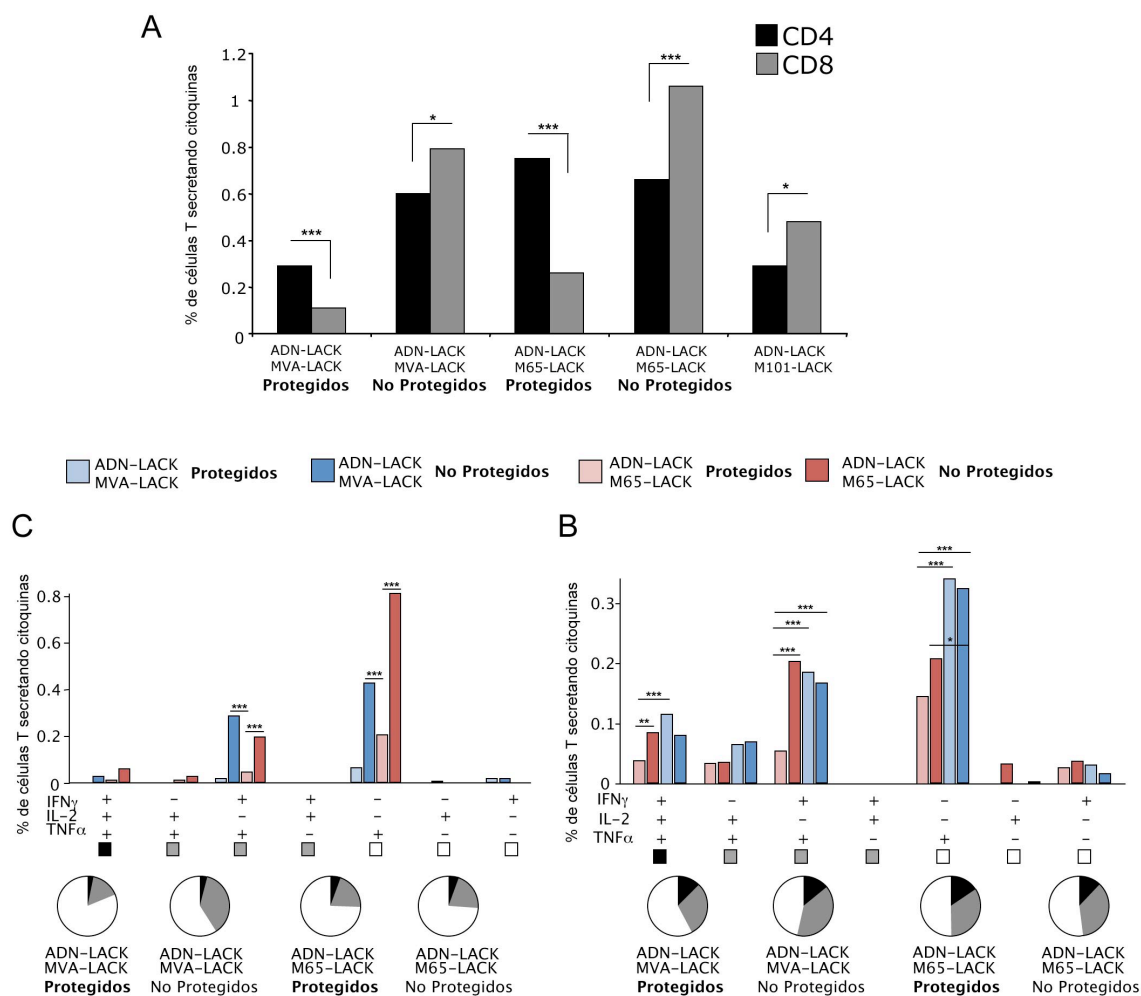
Por esta razón, decidimos separar dichos grupos en dos categorías: «protegidos» y «no protegidos» y hacer una caracterización de ambas categorías como hemos hecho con los distintos grupos en los otros puntos de las inmunizaciones.

Inicialmente, y como se puede observar en la Figura 26, la principal diferencia entre los ratones protegidos y no protegidos, tanto en el caso de aquellos inmunizados con el virus MVA-LACK como en el caso de aquellos inmunizados con el mutante M65-LACK fue una relación de células antígeno-específicas T CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> mayor en los animales protegidos.

Analizadas las distintas poblaciones secretoras de citoquinas, observamos que no hay un cambio en el patrón de células estimuladas, sino una diferencia en la magnitud y polifuncionalidad de las mismas, sobre todo en el caso de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

En el estudio en el que se analizó la capacidad protectora frente a *Leishmania amazonensis* los animales no pudieron ser separados entre «protegidos» y «no protegidos» puesto que sólo observamos un retraso y disminución en el tamaño de la lesión en los animales inmunizados con el mutante M65-LACK.

A pesar de ello estudiamos las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por si presentaran un patrón similar. Se observó un aumento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tanto en los grupos control como en el grupo inmunizado con el virus MVA-LACK, pero el balance de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas fue similar en los grupos inmunizados con el mutante M65-LACK y M101-LACK aunque la progresión de la enfermedad fuera distinta. Por lo tanto podemos inferir de estos resultados a este punto de la inmunización que las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas para el antígeno LACK podrían jugar un papel fundamental en el control de la enfermedad, sobre todo en el desafío con *L. major*. Futuros experimentos con un mayor número de animales deberían diseñarse con el objetivo de poder concluir si dichas poblaciones pudieran estar involucrados en la protección observada.



**Figura 26. Caracterización de las poblaciones celulares en ratones «protegidos» y «no protegidos» frente a la infección con *Leishmania major*.** A. Análisis de la magnitud total de la respuesta T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en esplenocitos estimulados con la proteína LACK entre grupos de animales protegidos y no protegidos. Entre la población de linfocitos, las células T fueron seleccionadas y la producción de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 fue analizada. Los porcentajes de células productoras de citoquinas en el grupo control inmunizado con virus parental fueron sustraídos antes de la representación. La producción de citoquinas por parte de células T CD8<sup>+</sup> LACK-específicas (B), o T CD4<sup>+</sup> LACK-específicas (C) se representa en los distintos paneles. Las diferentes combinaciones de citoquinas se indican en el eje x, mientras que los porcentajes de células T productoras de citoquinas se indican en el eje y. Los círculos muestran la polifuncionalidad de la respuesta, medida como la cantidad relativa de células productoras de una, dos o tres citoquinas simultáneamente. (\* p<0.05; \*\* p<0.005; \*\*\* p<0.0005).



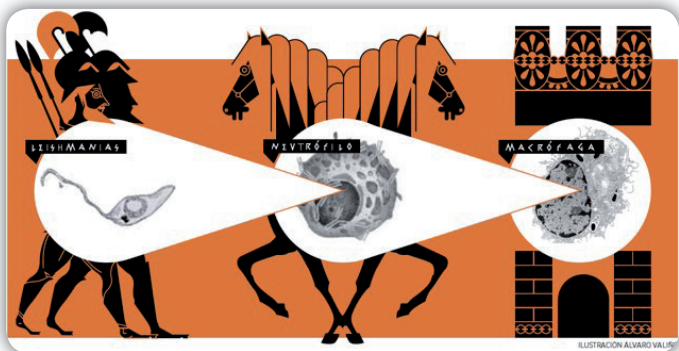
# Discusión

Discusión

Discusión

Discusión

Discusión



# 5



Desde que en el año 1796 Edward Jenner introdujese la vacunación como método de control frente a la viruela, se han realizado grandes avances en la lucha contra diferentes enfermedades. A pesar de que la única enfermedad erradicada hasta el momento ha sido la viruela (OMS, 1980), gracias a la vacunación se ha reducido la incidencia de otras muchas en más del 95 %. Entre estas enfermedades cabe destacar la poliomelitis (100 %), la difteria (99.9 %), el sarampión (99.8 %), la rubeola (99.6 %), las paperas (99.5 %) y la neumonía causada por *Haemophilus influenzae* tipo b (99 %) (Hinman, 1999).

En 1982, poco después de que la OMS declarara erradicada la viruela, el virus vaccinia empezó a utilizarse como vector de expresión eucariota (Mackett *et al.*, 1982; Panicali & Paoletti, 1982) y sus propiedades (capacidad para inducir respuestas inmunológicas duraderas, capacidad de incorporar y expresar grandes cantidades de ADN exógeno, estabilidad de su genoma y bajo coste de producción y mantenimiento), hicieron que pronto se reconociera a vaccinia como vector vacunal «universal» (Perkus *et al.*, 1995). Desde entonces, de entre todos los vectores virales, los poxvirus han sido unos de los vectores más prometedores para el desarrollo de vacunas recombinantes para combatir enfermedades prevalentes.

La primera generación de vacunas contra el cáncer, SIDA y muchas otras enfermedades infecciosas se basaron en virus vaccinia competentes en replicación como las cepas WR, Wyeth, Lister, Copenhagen o Tian Tan (Perkus *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 2009) pero debido a motivos de seguridad, la mayoría de los virus vaccinia utilizados en la actualidad como vectores vacunales no pueden replicar en humanos, como las cepas MVA o NYVAC.

A pesar de que estos vectores altamente atenuados son capaces de inducir inmunidad protectora ante una gran variedad de patógenos, su limitación en replicación podría reducir su potencial para inducir respuestas inmunológicas similares a las obtenidas con otros virus que sí mantienen dicha capacidad (Abaitua *et al.*, 2006; Karkhanis & Ross, 2007; Weyer *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2008).

Con el objetivo de encontrar un equilibrio entre seguridad y limitación en replicación, en nuestro laboratorio se han generado diferentes virus con un fenotipo intermedio.

En el presente trabajo se han caracterizado dos mutantes del virus vaccinia, M65 y M101, que son variantes del virus vaccinia obtenidas tras numerosas infecciones persistentes en células de eritroleucemia de ratón de Friend (Paez *et al.*, 1985b). En estudios previos realizados en el laboratorio, estos virus presentaron un tamaño de placa reducido en comparación con la cepa parental así como una producción de virus disminuida en comparación con el virus silvestre (Gómez, 2003). Dicho fenotipo les hacía perfectos candidatos como vectores vacunales intermedios que pudieran tener una competencia en replicación ligeramente limitada que les permitiera una expresión del antígeno heterólogo algo más extendida en el tiempo, pero que mostraran un fenotipo más atenuado que la cepa parental WR.

## ■ 1. Caracterización de la capacidad replicativa y atenuación de los virus mutantes

Una de las características más importantes del virus vaccinia es su capacidad de infectar un rango muy amplio de hospedadores vertebrados (Espósito, 1991). Esto se observa *in vitro* por su habilidad para replicar en múltiples líneas celulares. En condiciones de labo-



ratorio, el virus vaccinia se crece de forma rutinaria en líneas celulares derivadas de riñón de primates no humanos como las líneas VERO y BSC1/BSC40 (Meseda *et al.*, 2005; Abdalrhman *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007), de conejo, como las RK13 (Kidokoro *et al.*, 2005; Jentarra *et al.*, 2008), o de hámster (BHK21) (Jentarra *et al.*, 2008; Vijaysri *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se estudió la replicación de los mutantes en células de distinto origen, tanto aviar como murino y humano. Se analizó la capacidad de replicación en células embrionarias de pollo (CEF), debido a que son una de las líneas celulares autorizadas para la producción de vacunas, en células de ratón (3T3), al ser el ratón el modelo animal en el que vamos a estudiar el comportamiento *in vivo* de los mutantes, y en células humanas (HeLa), puesto que el objetivo final de estos candidatos vacunales sería su uso como vectores vacunales para humanos.

Como hemos visto, los dos virus mutantes M65 y M101 son capaces de replicar en las distintas líneas celulares aviares, murinas y humanas testadas, aunque el rendimiento viral obtenido tanto en forma de MV como EV se encuentra reducido en comparación con el virus parental WR. Esta reducción se observa mayoritariamente en las líneas celulares CEF y HELA y fue más patente en el mutante M101. Este resultado es esperable si tenemos en cuenta que ambos virus tienen un tamaño de placa reducido en comparación con la cepa parental y se ha descrito que tienen alteraciones en proteínas tardías implicadas en morfogénesis.

La habilidad de una cepa del VACV de crecer en determinadas líneas celulares no siempre correlaciona linealmente con su virulencia local o sistémica *in vivo* (Verardi *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2005; Abdalrhman *et al.*, 2006). Por lo tanto, tras caracterizar la replicación en células en cultivo y confirmar que ambas cepas replicaban en células de ratón, decidimos estudiar la capacidad replicativa *in vivo*, tras generar los virus recombinantes M65-Luc y M101-Luc que expresaban el gen de la luciferasa.

A pesar de las escasas diferencias observadas en ambos mutantes en la línea celular de ratón 3T3, amplias diferencias de replicación fueron observadas *in vivo*. El virus recombinante M65-Luc mostró un comportamiento similar al de la cepa WR-Luc, mostrando incluso niveles superiores de bioluminiscencia en órganos como ovarios o bazo. El mutante M101-Luc mostró un fenotipo más restringido, comparable al virus MVA-Luc en nódulos linfáticos y bazo, aunque mostró una replicación mantenida en órganos como los ovarios o en células de la cavidad peritoneal.

Debido a que estas diferencias en replicación podrían traducirse en diferente grado de atenuación *in vivo*, decidimos caracterizar el grado de patogenicidad producido por ambos mutantes tras su inoculación intranasal, que es una forma eficiente de estudiar la seguridad del VACV (Bloom *et al.*, 1991). Además, la cepa Western Reserve es altamente neuropatogénica, y replica dando títulos altos en nariz, pulmones, cerebro, ovarios y piel de distintas especies de ratón (Brandt *et al.*, 2005; Jentarra *et al.*, 2008; Vijaysri *et al.*, 2008).

Como era esperable, la cepa M101 mostró un grado de atenuación muy superior al observado por el mutante M65, debido a que los animales no perdieron peso ni mostraron otros signos de enfermedad a lo largo del experimento. Cuando se estudiaron histológicamente los pulmones de animales infectados, apenas se encontraron proteínas virales de vaccinia ni una modificación del epitelio bronquiolar. Sin embargo, los animales inoculados con las distintas dosis del virus M65 mostraron una pronunciada pérdida de peso así como la aparición de

diversos signos de enfermedad. A pesar de ello, sobrevivieron al desafío y recuperaron peso progresivamente, suceso que no ocurrió en los animales inoculados con 2 o 3 logaritmos de virus menos de la cepa parental WR, que tuvieron que ser sacrificados por motivos éticos. Cuando se estudiaron los pulmones de animales infectados por el mutante M65 sí se observaron proteínas virales a 5 días postinfección, así como otros signos de patología como son la presencia de hemorragias intersticiales o la modificación del epitelio. Dichos síntomas fueron de una gravedad superior en los animales infectados con la cepa WR.

A pesar de que los animales infectados con el virus M65 desarrollaran síntomas de enfermedad, hay que tener en cuenta que fueron inoculados con el equivalente a 100 o 1000 dosis letales de virus vaccinia y sobrevivieron al desafío, por lo tanto presenta un grado de atenuación importante en comparación con la cepa parental.

Otra observación relevante del experimento de patogénesis fue la obtenida al desafiar a los animales inoculados con las distintas dosis de los virus mutantes con 100 dosis letales de la cepa WR. En ambos casos no se observaron ni signos de enfermedad ni pérdida de peso, concluyendo que la inmunización con ambos virus es capaz de conferir inmunidad frente a un desafío letal con VACV.

## ■ 2. Caracterización del genoma de los virus mutantes

El genoma del virus vaccinia contiene una región central estable compuesta por genes involucrados en procesos de replicación, transcripción y morfogénesis y dos flancos compuestos fundamentalmente por genes involucrados en interacción virus/hospedador y respuesta inmunológica, cuya estabilidad genética se ve más comprometida.

En el presente trabajo, decidimos estudiar los genomas completos de los virus mutantes con el objetivo de conocer en qué medida los pases a los que fueron sometidos en células en cultivo habían alterado su genoma y también para intentar inferir el fenotipo que observamos en ambos virus a partir de la información obtenida de su genotipo.

Ambos virus compartían una delección en el extremo izquierdo del genoma que comprende en su mayoría genes de rango de hospedador así como genes inmuno-moduladores. Como vimos en la Figura 13 (página 74), la aparición de delecciones en el flanco izquierdo del genoma es un fenómeno común en varias cepas del virus vaccinia que se utilizan como vectores vacunales. Ejemplos de ello son la cepa Dairen I (obtenida tras 13 pases en huevos de un día de «edad» (Tagaya *et al.*, 1961) o MVA (generada tras más de 500 pases en células CEF (Meyer *et al.*, 1991)) que acumulan amplias delecciones en dicho extremo del genoma (de C9L a K5L en el caso de Dairen I y de C16L a C23L, de C8L a K1L y el gen K6L en el caso de MVA. Otra de las cepas vacunales que contiene delecciones en el flanco izquierdo del genoma es la cepa NYVAC (obtenida por la delección dirigida de 18 genes a partir de la cepa Copenhagen del virus vaccinia) que carece de la zona comprendida entre C7L y K1L.

La principal diferencia entre las tres cepas mencionadas y los mutantes M65 y M101 es que los virus mutantes mantienen intactos los genes N1L, N2L, M1L, M2L y K1L que están delecionados en MVA, NYVAC y Dairen I. Dicha región en concreto se eliminó del genoma de la cepa Tian Tan para aumentar la atenuación haciendo que la misma mostrara una capacidad replicativa disminuida en líneas celulares de humano y de conejo (Esteban, 2009).

Si comparamos los dos virus mutantes, la mayor diferencia se encuentra en una pequeña delección en el brazo derecho del genoma del virus M101 que no está presente en el virus M65. Dicha delección cubre los genes *A39R*, *A40R* y *WR208*. La ausencia de *A39R* no es relevante, debido a que es un gen que está truncado en la cepa parental WR, y, por lo tanto, también está truncado en M65, pero los otros dos genes, *A40R* y *WR208*, sí podrían tener un efecto debido a que son genes de interacción con la célula hospedadora.

Parte de las diferencias fenotípicas podrían explicarse en función del número de mutaciones presentes en ambos genomas. El virus M101 acumula un número mayor de mutaciones de cambio de sentido, particularmente en genes involucrados en la entrada del virus, morfogénesis y tamaño de placa, aunque ninguna de las mutaciones identificadas están descritas en la literatura como claves para la función de ninguno de sus genes.

### ■ 3. Los virus M65-LACK y M101-LACK como candidatos vacunales frente a la leishmaniasis

Para evaluar el potencial de los virus M65 y M101 como vectores vacunales, se generaron los virus recombinantes M65-LACK y M101-LACK con el objetivo de comparar la protección conferida con la obtenida con el virus no replicativo MVA-LACK, caracterizado previamente en el laboratorio y que ha otorgado protección frente a la leishmaniasis cutánea en los modelos murino y canino.

Estudios previos sugieren que puesto que *Leishmania major* mantiene una marcada persistencia en sus células hospedadoras (Sacks & Sher, 2002) y con ella una fuente constante de antígeno que podría requerirse para mantener una frecuencia alta de células polifuncionales efectoras. El requerimiento persistente de antígeno es un factor limitante para la mayoría de las vacunas no vivas (Uzonna *et al.*, 2001; Belkaid *et al.*, 2002a) que podría resultar en una cantidad insuficiente de células efectoras (Darrah *et al.*, 2007). A pesar de que la persistencia de los virus mutantes M65 y M101 no es comparable a la infección por el parásito *in vivo*, podría representar una buena alternativa. De hecho estudios previos con el antígeno LACK demostraron que la duración de la inmunidad frente a *L. major* conferida por la proteína LACK administrada como proteína recombinante era inferior a la obtenida con la vacunación con plásmidos que contenían la proteína LACK, debido a que con estos últimos la persistencia del antígeno era mayor (Gurunathan *et al.*, 1997).

Entre los protocolos de inmunización más eficaces a la hora de conferir una respuesta inmunológica celular se encuentra la inmunización heteróloga (Ramshaw & Ramsay, 2000). En ella la utilización combinada de vectores virales permiten la expresión del antígeno recombinante de forma intracelular, lo que resulta en la presentación antigénica vía MHC clase I, con la consiguiente inducción de células T CD8<sup>+</sup>.

Estudios anteriores en el laboratorio habían optimizado un protocolo de vacunación heterólogo que consistía en una dosis de ADN-LACK seguido de una segunda inmunización con el virus vaccinia recombinante dos semanas después, así que decidimos mantener el mismo protocolo con los virus mutantes. Los protocolos de inmunización basados en una

primera dosis de ADN seguido de una segunda dosis con un poxvirus recombinante son capaces de inducir una fuerte respuesta celular y altos niveles de protección en numerosos modelos animales e incluso en humanos (McConkey *et al.*, 2003; Sedegah *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2004; Vuola *et al.*, 2005). La eficacia del empleo de los poxvirus en el booster en la inducción de una respuesta inmune específica está ampliamente demostrada y en muchos casos correlaciona con protección (Zavala *et al.*, 2001). Previamente en nuestro laboratorio se había demostrado la inducción de protección parcial frente a la leishmaniasis cutánea en el modelo murino (Gonzalo *et al.*, 2002) y frente a la leishmaniasis visceral en perro, empleando una primera dosis de ADN-LACK y una segunda dosis con un virus vaccinia recombinante que expresaba la misma proteína (Ramiro *et al.*, 2003). Resultados similares se han obtenido utilizando otros antígenos de leishmania en protocolos heterólogos de este tipo (Carson *et al.*, 2009).

Además, estudios previos en el laboratorio en los que se comparaba la eficiencia de la inmunización con ADN-LACK con respecto a la inmunización combinada ADN-LACK/WR-LACK demostraron que esta última era más efectiva en la protección frente a la infección por *L. major* (Gonzalo *et al.*, 2002).

Con estos antecedentes establecimos como protocolo de inmunización para la comparación de los virus mutantes el protocolo heterólogo consistente en la inoculación de ADN-LACK seguida, dos semanas después, una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de vaccinia. Para el desafío seleccionamos inicialmente la dosis de  $5 \times 10^4$  promastigotes metacíclicos de *L. major*.

Como se observa en la Figura 15 (página 84) –representativa de los estudios de protección en los que el desafío fue tres semanas posterior a la inmunización con los distintos virus vaccinia recombinantes– los mayores niveles de protección se observaron en los ratones inmunizados con la combinación DNA-LACK/M101-LACK (similar a la obtenida con los que recibieron ADN-LACK/MVA-LACK) respecto a los ratones que fueron inmunizados con la combinación ADN-LACK/M65-LACK.

Debido a que el virus que mayor competencia en replicación poseía era el que menor protección otorgaba, hipotetizamos que posiblemente el problema podía residir en la proximidad temporal entre la dosis de virus y la infección con leishmania. Posiblemente en el caso del virus M65, capaz de replicar en distintos órganos durante un mayor período de tiempo, es posible que el sistema inmunológico no se reponga de la infección de la misma manera que en el caso del M101 o MVA. Aun así, en el pasado se observó protección con al protocolo ADN-LACK/WR-LACK siguiendo un protocolo similar, aunque con ciertas diferencias; la primera es que la dosis de virus era la mitad ( $1 \times 10^7$  ufp/ratón) y en segundo lugar que la dosis del parásito era  $5 \times 10^4$  promastigotes estacionarios y no metacíclicos. Es decir, no se purificaron para inocular solo los infectivos. A pesar de que no se muestra en los resultados de la presente tesis, los virus mutantes se utilizaron en una sola inmunización en la que se desafiaron con promastigotes estacionarios ( $10^5$  promastigotes/ratón) y solo el M65-LACK confirió cierta protección.

Por lo tanto decidimos espaciar temporalmente ambas inoculaciones, hecho que además ofrecía algunas ventajas, como hacer coincidir en el tiempo los estudios de memoria inmunológica con el desafío, obteniendo así información precisa del escenario inmunológico que aguardaba al parásito, el día del desafío.

Cuando los animales fueron desafiados con  $5 \times 10^4$  promastigotes metacíclicos 8 semanas tras la inmunización con los distintos virus recombinantes (día 67), se observaron mayores niveles de protección en los ratones inmunizados con la combinación ADN-LACK/M65-LACK (similar a la obtenida con los que recibieron ADN-LACK/MVA-LACK) respecto a los inmunizados con la combinación ADN-LACK/M101-LACK que no mostraban diferencias con los controles de inmunización.

Por último decidimos evaluar la protección frente a otro modelo de leishmaniasis cutánea que no fuera el causado por *L. major*, como es el de *L. amazonensis*.

Hasta la fecha ningún protocolo de vacunación con el antígeno LACK había conferido protección frente a la leishmaniasis americana causada por *L. amazonensis* (Coelho *et al.*, 2003), por lo que decidimos ensayar los virus mutantes MVA-LACK, M65-LACK y M101-LACK en el mismo protocolo de vacunación heterólogo desafiando a los animales 8 semanas después de la inmunización con los distintos virus. Como se puede observar en la Figura 17 (página 85), los únicos animales que mostraron cierto retardo en el desarrollo de las lesiones, así como una disminución en el tamaño de las mismas fueron los inmunizados con la combinación ADN-LACK/M65-LACK.

Puesto que el virus MVA-LACK confería protección en los distintos tiempos a los que realizamos el desafío, la competencia en replicación no era un parámetro que *per se* pudiera explicar la diferencia en los grados de protección obtenidos. Como demostraron originalmente Morgan y colaboradores (Morgan *et al.*, 1988) el background genético puede influenciar la eficacia en inducir protección, al no conseguir proteger monos tití (*Saguinus Oedipus*) con recombinantes basados en la cepa Wyeth y sí con los basados en la cepa WR del VACV. Habría que tener en cuenta, entonces, que las propiedades inmunogénicas del vector MVA, debido a la ausencia en su genoma de una gran cantidad de inmunomoduladores en comparación con los virus mutantes, podrían ser potencialmente distintas. Sin embargo, los mutantes M65 y M101 que son más similares genéticamente en cuanto a genes inmunomoduladores se refiere (solo el M101 tiene dos genes deletados diferencialmente con M65: *A40R* y *WR208*), difieren principalmente en su capacidad replicativa, que puede repercutir en una inmunogenicidad diferencial que pudiera explicar las diferencias en protección. Por lo tanto, decidimos estudiar las poblaciones celulares implicadas en la inmunización con los distintos protocolos con el fin de estudiar las posibles respuestas inmunológicas inducidas por los distintos virus recombinantes en el protocolo de vacunación heterólogo.

#### ■ 4. Los virus mutantes M65 y M101 estimulan preferentemente distintas poblaciones celulares

Las distintas poblaciones de células T tienen un papel clave en la protección frente a un amplio rango de patógenos. En particular, los linfocitos T, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, desempeñan un rol central en el control del desarrollo de varias enfermedades. En el caso de la leishmaniasis, varios estudios se han realizado para diseccionar el papel de dichas células en la infección natural por el parásito (Faria *et al.*, 2009; Nateghi Rostami *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2011; Keesen *et al.*, 2011; Khamesipour *et al.*, 2012;), en profilaxis (Darrach *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2009; Darrach *et al.*, 2010; Kedzierska *et al.*, 2012) o en terapia (Papadogiannakis *et al.*, 2010).



Por lo tanto, era de sumo interés estudiar dichas poblaciones en nuestro protocolo de inmunización heterólogo y evaluar el impacto de los distintos virus en las mismas. Para ello, decidimos estudiar la respuesta inmunológica adaptativa, así como la respuesta a distintos tiempos tempranos postdesafío, la respuesta de memoria y finalmente la respuesta a tiempos tardíos postinfección.

Como se observa en la sección de Resultados, en los distintos puntos estudiados, las distintas poblaciones LACK-específicas estimuladas por los distintos virus eran similares.

La respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> se vio representada por un elevado porcentaje de células que secretaban conjuntamente IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  así como células simples secretoras para IFN $\gamma$  o TNF $\alpha$ . Estas células podrían jugar un papel fundamental en el control de la patología puesto que ambas citoquinas tienen un efecto sinérgico para combatir la leishmaniasis (Bogdan *et al.*, 1990; Liew *et al.*, 1990) debido a la inducción de NO (Pingel *et al.*, 1999; Cote-Sierra *et al.*, 2002). Además, la alta frecuencia de células productoras de TNF $\alpha$  se ha visto que correlaciona con protección (Liew *et al.*, 1991; Cote-Sierra *et al.*, 2002) debido presumiblemente a la estimulación que ejerce sobre la capacidad microbicida de los macrófagos (Green *et al.*, 1990). Estas células doble productoras además adquieren un papel fundamental, ya que como observamos al incluir el marcador indirecto de degranulación CD107, las poblaciones doble secretoras IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  son altamente citotóxicas, pudiendo tener un papel crucial en la eliminación de células infectadas.

Otra observación común en todos los grupos inmunizados es que la infección con el parásito provoca una reducción progresiva de la polifuncionalidad de las células CD8<sup>+</sup> conforme progresa la infección. Estos cambios de poblaciones dentro de los linfocitos CD8<sup>+</sup> podrían tener profundas implicaciones en su función efectora o en su establecimiento como células de memoria (Darrah *et al.*, 2007).

La única diferencia que observamos en entre los grupos inmunizados con los distintos virus reside en la magnitud de la respuesta de las distintas poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> LACK-específicos. En los animales inmunizados con los virus MVA-LACK y M101-LACK, especialmente con el virus M101-LACK, la magnitud de esta población es mayor cuando estudiamos la respuesta inmunológica adaptativa, cuando estudiamos la respuesta de memoria, así como a distintos puntos postinfección con el parásito. A diferencia de los dos grupos anteriores, los animales inmunizados con el virus M65-LACK indujeron una proporción más reducida de linfocitos CD8<sup>+</sup> LACK-específicos.

Cuando estudiamos la respuesta de células T CD4<sup>+</sup> vimos que esta es altamente polifuncional en los distintos puntos estudiados y está representada por un alto porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> secretoras de las tres citoquinas estudiadas, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2, diferentes poblaciones de dobles positivas y también células secretoras de una única citoquina, fundamentalmente TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$ .

De nuevo, como observamos en el caso de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> LACK-específicos, las únicas diferencias que encontramos entre los virus radican en la magnitud de la respuesta. A pesar de que en la respuesta inmunológica adaptativa observamos una amplia respuesta CD4<sup>+</sup> LACK-específica en el caso de animales inmunizados con el recombinante M101-LACK, dicha respuesta es claramente superior en el resto de los puntos estudiados –sobre todo en memoria– por parte del mutante M65-LACK, siendo la más baja la inducida por el virus MVA-LACK. Además, esta diferencia se hace más patente si estudiamos la respuesta inducida frente al péptido T CD4<sup>+</sup> LACK<sub>157-173'</sub>, un péptido altamente relevante en la inmunopatología de la leishmaniasis (Launois *et al.*, 1997; Reiner *et al.*, 1998; Pingel *et al.*, 1999; Launois *et al.*, 2007).

Esta mayor magnitud de respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> podría explicarse por la mayor competencia en replicación del virus M65, ya que como describían Obst y cols. el desarrollo de una respuesta T CD4<sup>+</sup> requiere una mayor persistencia de antígeno (Obst *et al.*, 2005).

Además de los cambios en magnitud total, la diferencia más significativa cuando separamos animales protegidos y animales no protegidos en la inmunización en la que desafiamos a los animales con *L. major*, ha sido observar que la relación de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> de linfocitos LACK-específicos era marcadamente diferente en los distintos grupos. Los animales protegidos mantenían una relación de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> alta, mientras que los animales no protegidos tenían una relación de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> baja, debido a un aumento en la magnitud de la respuesta T CD8<sup>+</sup>. Así como vimos una disminución en la polifuncionalidad de la respuesta T CD8<sup>+</sup> conforme la infección avanzaba, también se puede observar en los animales inmunizados una disminución en el ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, salvo en los animales inmunizados con el M65-LACK.

El aumento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en individuos infectados es algo que se ha observado en la progresión de lesiones en individuos infectados con *L. major* (Da-Cruz *et al.*, 1994; Gaafar *et al.*, 1999; Da-Cruz *et al.*, 2002; Da-Cruz *et al.*, 2005) circunstancia que involucra a estas células en el desarrollo de la enfermedad y potencialmente en su cura. Está descrito que el papel de los linfocitos en la resolución de las infecciones puede ser secundario, ya que su ausencia es dispensable para la resolución de lesiones (Erb *et al.*, 1996; Stebut, 2007). Aun así, varios grupos han demostrado su requerimiento en el modelo de ratón BALB/c (Muller *et al.*, 1991; Uzonna *et al.*, 2004a) y en C57BL6 utilizando dosis bajas de parásito (Belkaid *et al.*, 2002b). En humanos, altos niveles de linfocitos T CD8<sup>+</sup> LmaCIN (Leishmania amastigote clase I antígeno)-específicos se obtuvieron de PMBC de pacientes que curaron la leishmaniasis producida por *L. major* (Farajnia *et al.*, 2005).

En cuanto al papel de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, múltiples son los estudios científicos que relacionan las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> secretoras de las citoquinas Th1 IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  o IL-2 con protección frente a la leishmaniasis, tanto en estudios de distintas formulaciones vacunales (Coler *et al.*, 2007; Darrah *et al.*, 2007; Kedzierska *et al.*, 2012), como en pacientes humanos que han resuelto la enfermedad (Macedo *et al.*, 2012).

Existen sin embargo múltiples parámetros que podrían estar influenciando los distintos grados de protección conferidos por los distintos virus mutantes que no se han estudiado en la presente tesis. Estudios recientes de vacunas basadas en adenovirus demuestran que la diferencia entre protección y susceptibilidad obtenidas por inoculación con dosis bajas o elevadas de virus, reside en una susceptibilidad ligada a la producción de IL-10 por parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> inducidos por dosis altas de virus (Darrah *et al.*, 2010). La mayor o menor competencia en replicación también podría jugar un papel similar a la del efecto dosis, por lo que la IL-10 es objetivo de futuros estudios.

Además existen otras poblaciones celulares que podrían estar implicadas, como son las células T reguladoras, que juegan un papel crucial en la infección por leishmania (Belkaid *et al.*, 2002a; Belkaid & Rouse, 2005).

Todos estos resultados en su conjunto muestran que los virus mutantes M65 y M101 poseen diferencias inmunogénicas, siendo el M65 un mejor inductor de respuestas T CD4<sup>+</sup> mientras que el virus M101 induce una potente respuesta T CD8<sup>+</sup>.



La Tabla 6 resume las principales diferencias entre los mutantes M65 y M101 derivadas del presente estudio.

		M65	M101
Replicación	Tamaño de placa	Intermedio	Pequeño
	Replicación <i>in vitro</i>	++	+
	Replicación <i>in vivo</i>	Similar a WR. Niveles altos de luciferasa a 72 horas en ovarios y células de la cavidad peritoneal	Similar a MVA. Niveles detectables en ovarios y células de la cavidad peritoneal
Patogénesis	Pérdida de peso	Patente tanto en los animales desafiados con 10 <sup>7</sup> ó 10 <sup>8</sup> ufp/ratón	No se ha observado pérdida de peso ni en los animales desafiados con 10 <sup>7</sup> ufp/ratón o 10 <sup>8</sup> ufp/ratón
	Signos de enfermedad	Pelo erizado, movilidad reducida y encorvamiento	No se observaron signos de enfermedad
	Histopatología	Extravasación y acumulación leucocitarias. Inflamación severa del epitelio. Presencia de proteínas virales en las zonas afectadas	Presencia de acumulaciones leucocitarias. Modificación del epitelio leve y marca residual de proteínas virales
Genomas	Deleciones	Delección flanco izquierdo del genoma	Delección flanco izquierdo del genoma + A39R-A40R-WR208 en el flanco derecho
	Mutaciones	59 genes contienen mutaciones de cambio de aminoácido.	61 genes contienen mutaciones de cambio de aminoácido. Mayor número de mutaciones por gen.
Protección leishmania	Desafío 3 semanas <i>postbooster</i> (Día 35)	No se observa protección frente a <i>L. major</i> .	Protección frente a <i>L. major</i>
	Desafío 8 semanas <i>postbooster</i> (Día 67)	Protección frente a <i>L. major</i> y disminución en el tamaño de la lesión frente a <i>L. amazonensis</i>	No se observa protección frente a <i>L. major</i> ni frente a <i>L. amazonensis</i>
Respuesta inmunológica	Respuesta celular adaptativa	Baja magnitud y alta polifuncionalidad de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> LACK-específicos	Alta magnitud y alta polifuncionalidad de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> LACK-específicos
	Respuesta celular de memoria	La respuesta de memoria frente al antígeno LACK está mayoritariamente representada por células T CD4 <sup>+</sup> polifuncionales	La respuesta de memoria frente al antígeno LACK está mayoritariamente representada por células T CD8 <sup>+</sup> polifuncionales
	Respuesta celular postdesafío	Tanto a 10 días como a 28 días postinfección el balance CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> muestra una respuesta T CD4 <sup>+</sup> mayoritaria frente al antígeno LACK	Tanto a 10 días como a 28 días postinfección el balance CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> muestra una respuesta T CD8 <sup>+</sup> mayoritaria frente al antígeno LACK
	Respuesta celular protección	El balance de células T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> muestra una respuesta T CD4 <sup>+</sup> mayoritaria frente al antígeno LACK en animales protegidos y CD8 <sup>+</sup> en no protegidos frente a <i>L. major</i>	El balance CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> muestra una respuesta T CD8 <sup>+</sup> mayoritaria frente al antígeno LACK

**Tabla 6.** Diferencias entre los mutantes M65 y M101.

## ■ 5. Futura Aplicación de los virus M65 y M101

Cuando se caracteriza y estudia las propiedades de distintos virus como vectores vacunales hay que tener en cuenta su posible aplicación futura en clínica. En este sentido, los virus mutantes M65 y M101 han mostrado distintas propiedades que los hace interesantes candidatos vacunales así como características que podrían optimizarse.

En el laboratorio hemos observado que, aunque casi todas las cepas del virus vaccinia utilizadas con distintos antígenos heterólogos producen una estimulación similar de poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup>, entre ellos hay pequeñas diferencias en la magnitud de la respuesta que podrían marcar la diferencia entre eficiencia y fracaso de una vacuna, en función de las necesidades de un modelo de patología en concreto. Dentro de esta respuesta general de vaccinia, el virus M65 se desmarca del resto de los virus utilizados en una inducción superior de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, ligada seguramente a una mayor persistencia de antígeno debida a su mayor replicación (Obst *et al.*, 2005). Del mismo modo el virus M101 induce preferentemente linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Esta peculiaridad en la inducción diferencial de poblaciones es una de sus grandes ventajas cuando se comparan con otras cepas de poxvirus que tienen un perfil intermedio en la estimulación de estas poblaciones celulares.

Además, la competencia en replicación de ambos vectores añadida a sus propiedades inmunológicas podría hacerles excelentes vectores oncolíticos en la lucha contra distintos tipos de cáncer, dada la eficiencia demostrada de distintas cepas de poxvirus como agentes oncolíticos y vacunas contra el cáncer (Guse *et al.*, 2011).

Sin embargo, la competencia en replicación mostrada por el M65 también ha demostrado un posible riesgo que debe ser estudiado en mayor profundidad, pero que presenta una optimización sencilla: la delección selectiva de genes descritos que producen atenuación del vector (Kibler *et al.*, 2011).

El M101 podría presentar una posible desventaja y es que estudios previos demuestran que el virus es más lábil que otras cepas como MVA, M65 o WR. Aun así, hemos observado en el laboratorio que se pueden optimizar las condiciones de purificación del virus para obtener títulos suficientes y similares a otras cepas modificando las condiciones y los protocolos de purificación.

Por lo tanto y en su conjunto nuestros resultados muestran dos nuevos vectores con propiedades atractivas que les hace interesantes como posibles herramientas para la lucha contra enfermedades prevalentes.

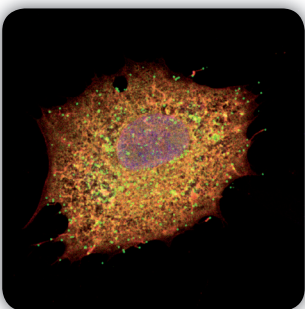
# Conclusiones

Conclusiones

Conclusiones

Conclusiones

Conclusiones



# 6



1. Los virus mutantes M65 y M101 son capaces de replicar en las líneas celulares CEF, 3T3 y HeLa, aunque su crecimiento está ligeramente disminuído en comparación con su cepa parental.
2. Los virus mutantes M65 y M101 muestran una capacidad replicativa diferencial *in vivo*. El virus recombinante M65-Luc mostró niveles de replicación similares a los del virus parental WR-Luc, mientras que el virus M101-Luc mostró niveles reducidos de replicación similares a la cepa MVA-Luc, salvo en ovarios y células del peritoneo.
3. Los virus mutantes M65 y M101 muestran una reducción en la patogénesis en comparación con el virus parental, aunque difieren en el nivel de atenuación. Los animales inoculados con el virus M65 mostraron diversos signos de enfermedad y una pérdida de peso acusada, aunque resolvieron la infección; mientras que los animales inoculados con el virus M101 no perdieron peso ni mostraron signo de enfermedad alguno.
4. La infección por parte de ambos virus es capaz de generar inmunidad frente a un desafío con el virus vaccinia WR.
5. Los virus mutantes muestra una delección compartida en el flanco izquierdo del genoma y una delección exclusiva de la cepa M101 en el flanco derecho del genoma. Ambos virus acumulan un notable número de mutaciones en genes involucrados en entrada y morfogénesis, acumulando un mayor número el mutante M101.
6. Los virus M65 y M101 recombinantes para el antígeno LACK son capaces de ofrecer distintos grados de protección frente a la leishmaniasis cutánea causada por *L. major*, administrados en un protocolo de vacunación heterólogo ADN/Poxvirus. El virus M101-LACK confirió una disminución del 42 % en el tamaño de la lesión cuando se desafió con los parásitos a tiempos tempranos postvacunación, mientras que el virus M65-LACK únicamente protegió cuando el desafío con el parásito se administró a los tiempos a los que se estudia la memoria inmunológica. En dicho caso indujo una disminución del tamaño de la lesión del 59 %.
7. El virus M65-LACK es capaz de provocar una disminución del tamaño de las lesiones de un 45 % así como un retraso en su formación en el modelo de leishmaniasis cutánea causada por la cepa *L. amazonensis*.
8. Los virus mutantes M65-LACK y M101-LACK impactan en las mismas poblaciones celulares de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> si bien inducen una magnitud diferencial de las mismas, estimulando el virus M65 preferencialmente los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y el M101 los T CD8<sup>+</sup>.
9. El estudio de poblaciones entre animales protegidos y no protegidos sugiere una posible correlación entre la proporción CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> LACK-específico y protección que debe ser estudiada en profundidad.



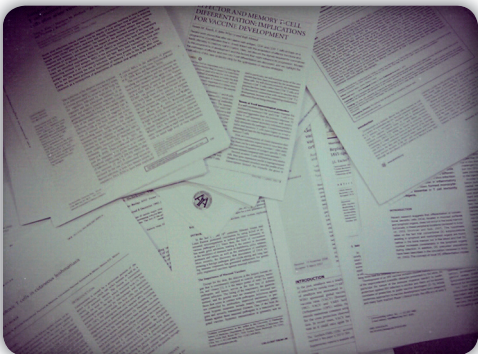
# Bibliografía

Bibliografía

Bibliografía

Bibliografía

Bibliografía



# 7





- A** Abaitua, F., Rodriguez, J. R., Garzon, A., Rodriguez, D. & Esteban, M. (2006). Improving recombinant MVA immune responses: potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing Env and the cytokines IL-12 and IFN-gamma. *Virus Res* **116**, 11-20.
- Abdalrhman, I., Gurt, I. & Katz, E. (2006). Protection induced in mice against a lethal orthopox virus by the Lister strain of vaccinia virus and modified vaccinia virus Ankara (MVA). *Vaccine* **24**, 4152-4160.
- Afonso, L. C., Scharton, T. M., Vieira, L. Q., Wysocka, M., Trinchieri, G. & Scott, P. (1994). The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* **263**, 235-237.
- Ahmed, S. B. H., Bahloul, C., Robbana, C., Askri, S. & Dellagi, K. (2004). A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine* **22**, 1631.
- Ahuja, S. S., Reddick, R. L., Sato, N., Montalbo, E., Kostecki, V., Zhao, W., Dolan, M. J., Melby, P. C. & Ahuja, S. K. (1999). Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *J Immunol* **163**, 3890-3897.
- Alexander, J., Coombs, G. H. & Mottram, J. C. (1998). *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol* **161**, 6794-6801.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R. & other authors (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* **21**, 334-359, table of contents.
- Anderson, R. & Dales, S. (1978). Biogenesis of poxviruses: glycolipid metabolism in vaccinia-infected cells. *Virology* **84**, 108-117.
- Arakawa, Y., Cordeiro, J. V., Schleich, S., Newsome, T. P. & Way, M. (2007). The release of vaccinia virus from infected cells requires RhoA-mDia modulation of cortical actin. *Cell host & microbe* **1**, 227-240.
- B** Barbi, J., Brombacher, F. & Satoskar, A. R. (2008). T cells from *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice have a defect in efficiently up-regulating CXCR3 upon activation. *J Immunol* **181**, 4613-4620.
- Bayliss, C. D. & Smith, G. L. (1996). Vaccinia virion protein I8R has both DNA and RNA helicase activities: implications for vaccinia virus transcription. *Journal of virology* **70**, 794-800.
- Beaud, G., Beaud, R. & Leader, D. P. (1995). Vaccinia virus gene H5R encodes a protein that is phosphorylated by the multisubstrate vaccinia virus B1R protein kinase. Vaccinia Virus Gene H5R Encodes a Protein That Is Phosphorylated by the Multisubstrate Vaccinia Virus B1R Protein Kinase Downloaded from <http://jvi.asm.org/> on January 27, 2012 by UAM / SERVICIO DE DOCUMENTACION. *Microbiology* **69**.

- Belkaid, Y. & Rouse, B. T. (2005).** Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature immunology* **6**, 353.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A. & Mendez, S. (2002a).** CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* **420**, 633.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J. & Sacks, D. L. (1998).** Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* **188**, 1941-1953.
- Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M. C. & Sacks, D. (2002b).** CD8<sup>+</sup> T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* **168**, 3992-4000.
- Berberich, C., Ramirez-Pineda, J. R., Hambrecht, C., Alber, G., Skeiky, Y. A. & Moll, H. (2003).** Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol* **170**, 3171-3179.
- Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M. & Koup, R. A. (2003).** Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* **281**, 65-78.
- Blasco, R. & Moss, B. (1991a).** Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *J Virol* **65**, 5910-5920.
- Blasco, R. & Moss, B. (1991b).** Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *Journal of virology* **65**, 5910-5920.
- Bloom, D. C., Edwards, K. M., Hager, C. & Moyer, R. W. (1991).** Identification and characterization of two nonessential regions of the rabbitpox virus genome involved in virulence. *J Virol* **65**, 1530-1542.
- Bogdan, C., Moll, H. & Rollinghoff, M. (1990).** Tumor necrosis factor- $\alpha$  in combination with interferon, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *European journal of immunology*, 1131.
- Borja-Cabrera, G. P., Cruz Mendes, A., Paraguai de Souza, E., Hashimoto Okada, L. Y., de, A. T. F. A., Kawasaki, J. K., Costa, A. C., Reis, A. B., Genaro, O. & other authors (2004).** Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* **22**, 2234-2243.
- Brandt, T., Heck, M. C., Vijaysri, S., Jentarra, G. M., Cameron, J. M. & Jacobs, B. L. (2005).** The N-terminal domain of the vaccinia virus E3L-protein is required for neurovirulence, but not induction of a protective immune response. *Virology* **333**, 263-270.
- Broyles, S. S. (2003).** Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol* **84**, 2293-2303.
- Buller, R. M. & Palumbo, G. J. (1991).** Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev* **55**, 80-122.

- © **Cabrera, M., Blackwell, J. M., Castes, M., Trujillo, D., Convit, J. & Shaw, M. A. (2000).** Immunotherapy with live BCG plus heat killed *Leishmania* induces a T helper 1-like response in American cutaneous leishmaniasis patients. *Parasite Immunol* **22**, 73-79.
- Carrasco, L. A., JM (2006).** *Virus Patógenos*. Hélice.
- Carroll, M. W. & Moss, B. (1995).** *E. coli* beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses. *Biotechniques* **19**, 352-354, 356.
- Carson, C., Antoniou, M., Ruiz-Arguello, M. B., Alcami, A., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Blackwell, J. M. & Courtenay, O. (2009).** A prime/boost DNA/Modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing recombinant *Leishmania* DNA encoding TRYP is safe and immunogenic in outbred dogs, the reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vaccine* **27**, 1080-1086.
- Chakravarty, J., Kumar, S., Trivedi, S., Rai, V. K., Singh, A., Ashman, J. A., Laughlin, E. M., Coler, R. N., Kahn, S. J. & other authors (2011).** A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. *Vaccine* **29**, 3531-3537.
- Chamizo, C., Moreno, J. & Alvar, J. (2005).** Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* **103**, 67-75.
- Champsi, J. & McMahon-Pratt, D. (1988).** Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun* **56**, 3272-3279.
- Chernos, V. I., Vovk, T. S., Ivanova, O. N., Antonova, T. P. & Loparev, V. N. (1993).** [Insertion mutants of the vaccinia virus. The effect of inactivating E7R and D8L genes on the biological properties of the virus]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 30-34.
- Choi, C. M. & Lerner, E. A. (2001).** Leishmaniasis as an emerging infection. *J Investig Dermatol Symp Proc* **6**, 175-182.
- Coelho, E. A., Tavares, C. A., Carvalho, F. A., Chaves, K. F., Teixeira, K. N., Rodrigues, R. C., Charest, H., Matlashewski, G., Gazzinelli, R. T. & other authors (2003).** Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Infect Immun* **71**, 3988-3994.
- Colamonici, O. R., Domanski, P., Sweitzer, S. M., Lerner, A. & Buller, R. M. (1995).** Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. *J Biol Chem* **270**, 15974-15978.
- Coler, R. N. & Reed, S. G. (2005).** Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* **21**, 244-249.
- Coler, R. N., Goto, Y., Bogatzki, L., Raman, V. & Reed, S. G. (2007).** Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun* **75**, 4648-4654.

- Cooray, S., Bahar, M. W., Abrescia, N. G. a., McVey, C. E., Bartlett, N. W., Chen, R. a.-J., Stuart, D. I., Grimes, J. M. & Smith, G. L. (2007). Functional and structural studies of the vaccinia virus virulence factor N1 reveal a Bcl-2-like anti-apoptotic protein. *The Journal of general virology* **88**, 1656-1666.
- Cote-Sierra, J., Bredan, A., Toldos, C. M., Stijlemans, B., Brys, L., Cornelis, P., Segovia, M., de Baetselier, P. & Revets, H. (2002). Bacterial lipoprotein-based vaccines induce tumor necrosis factor-dependent type 1 protective immunity against *Leishmania major*. *Infect Immun* **70**, 240-248.
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H. & Grimaldi, G., Jr. (2000). A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today* **16**, 142-144.
- D** Da Silva, M. & Upton, C. (2009). Vaccinia virus G8R protein: a structural ortholog of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *PloS one* **4**, e5479-e5479.
- Da Silva, M., Shen, L., Tcherepanov, V., Watson, C. & Upton, C. (2006). Predicted function of the vaccinia virus G5R protein. *Bioinformatics (Oxford, England)* **22**, 2846-2850.
- da Silva, V. O., Borja-Cabrera, G. P., Correia Pontes, N. N., de Souza, E. P., Luz, K. G., Palatnik, M. & Palatnik de Sousa, C. B. (2000). A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN). *Vaccine* **19**, 1082-1092.
- Da-Cruz, A. M., Conceicao-Silva, F., Bertho, A. L. & Coutinho, S. G. (1994). Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* **62**, 2614-2618.
- Da-Cruz, A. M., Bertho, A. L., Oliveira-Neto, M. P. & Coutinho, S. G. (2005). Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol* **153**, 537-543.
- Da-Cruz, A. M., Bittar, R., Mattos, M., Oliveira-Neto, M. P., Nogueira, R., Pinho-Ribeiro, V., Azeredo-Coutinho, R. B. & Coutinho, S. G. (2002). T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**, 251-256.
- Dai, K., Liu, Y., Liu, M., Xu, J., Huang, W., Huang, X., Liu, L., Wan, Y., Hao, Y. & other authors (2008). Pathogenicity and immunogenicity of recombinant Tiantan Vaccinia Virus with deleted C12L and A53R genes. *Vaccine* **26**, 5062-5071.
- Dales, S. (1965). Replication of Animal Viruses as Studied by Electron Microscopy. *Am J Med* **38**, 699-715.
- Dales, S. & Pogo, B. G. (1981). Biology of poxviruses. *Viol Monogr* **18**, 1-109.
- Darrah, P. A., Hegde, S. T., Patel, D. T., Lindsay, R. W., Chen, L., Roederer, M. & Seder, R. A. (2010). IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform. *J Exp Med* **207**, 1421-1433.

- Darrah, P. a., Patel, D. T., De Luca, P. M., Lindsay, R. W. B., Davey, D. F., Flynn, B. J., Hoff, S. r. T., Andersen, P., Reed, S. G. & other authors (2007). Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nature medicine* **13**, 843.
- Demkowicz, W. E., Maa, J. S. & Esteban, M. (1992). Identification and characterization of vaccinia virus genes encoding proteins that are highly antigenic in animals and are immunodominant in vaccinated humans. *J Virol* **66**, 386-398.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**, 305-318.
- Ding, A. H., Nathan, C. F. & Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* **141**, 2407-2412.
- DiPerna, G., Stack, J., Bowie, A. G., Boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., Arvikar, S., Latz, E., Fitzgerald, K. A. & other authors (2004). Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J Biol Chem* **279**, 36570-36578.
- Domi, A., Weisberg, A. S. & Moss, B. (2008). Vaccinia virus E2L null mutants exhibit a major reduction in extracellular virion formation and virus spread. *Journal of virology* **82**, 4215-4226.
- Doyle, T. C., Burns, S. M. & Contag, C. H. (2004). In vivo bioluminescence imaging for integrated studies of infection. *Cell Microbiol* **6**, 303-317.
- Dulbecco, R. & Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**, 396-397.
- Dumonteil, E., Andrade-Narvarez, F., Escobedo-Ortegon, J., Ramirez-Sierra, M. J., Valencia-Pacheco, G., Flores-Serrano, A., Canto-Lara, S. & Arjona-Torres, A. (2000). Comparative study of DNA vaccines encoding various antigens against *Leishmania mexicana*. *Dev Biol (Basel)* **104**, 135-141.
- E** Earley, A. K., Chan, W. M. & Ward, B. M. (2008). The vaccinia virus B5 protein requires A34 for efficient intracellular trafficking from the endoplasmic reticulum to the site of wrapping and incorporation into progeny virions. *Journal of virology* **82**, 2161-2169.
- Eckert, D., Williams, O., Meseda, C. A. & Merchlinsky, M. (2005). Vaccinia virus nicking-joining enzyme is encoded by K4L (VACWR035). *J Virol* **79**, 15084-15090.
- Edinger, M., Sweeney, T. J., Tucker, A. A., Olomu, A. B., Negrin, R. S. & Contag, C. H. (1999). Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia* **1**, 303-310.
- Ehrchen, J. M., Roebrock, K., Foell, D., Nippe, N., von Stebut, E., Weiss, J. M., Munck, N. A., Viemann, D., Varga, G. & other authors (2010). Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog* **6**, e1000871.



- Erb, K., Blank, C., Ritter, U., Bluethmann, H. & Moll, H. (1996).** Leishmania major infection in major histocompatibility complex class II-deficient mice: CD8+ T cells do not mediate a protective immune response. *Immunobiology* **195**, 243-260.
- Espósito, J. J. (1991).** *Poxviridae*, vol. Classification and Nomenclature of Viruses. New York: Springer-Verlag.
- Espósito, J. J., Obijeski, J. F. & Nakano, J. H. (1977a).** The virion and soluble antigen proteins of variola, monkeypox, and vaccinia viruses. *J Med Virol* **1**, 95-110.
- Espósito, J. J., Obijeski, J. F. & Nakano, J. H. (1977b).** Serological relatedness of monkeypox, variola, and vaccinia viruses. *J Med Virol* **1**, 35-47.
- Essani, K. & Dales, S. (1979).** Biogenesis of vaccinia: evidence for more than 100 polypeptides in the virion. *Virology* **95**, 385-394.
- Esteban, M. (1984).** Defective vaccinia virus particles in interferon-treated infected cells. *Virology* **133**, 220-227.
- Esteban, M. (2009).** Attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC as promising vaccine candidates against HIV/AIDS. *Hum Vaccin* **5**, 867-871.
- Esteban, M., Flores, L. & Holowczak, J. A. (1977).** Model for vaccinia virus DNA replication. *Virology* **83**, 467-473.
- F Fang, Q., Yang, L., Zhu, W., Liu, L., Wang, H., Yu, W., Xiao, G., Tien, P., Zhang, L. & other authors (2005).** Host range, growth property, and virulence of the smallpox vaccine: vaccinia virus Tian Tan strain. *Virology* **335**, 242-251.
- Farajnia, S., Mahboudi, F., Ajdari, S., Reiner, N. E., Kariminia, A. & Alimohammadian, M. H. (2005).** Mononuclear cells from patients recovered from cutaneous leishmaniasis respond to Leishmania major amastigote class I nuclease with a predominant Th1-like response. *Clin Exp Immunol* **139**, 498-505.
- Faria, D. R., Souza, P. E., Duraes, F. V., Carvalho, E. M., Gollob, K. J., Machado, P. R. & Dutra, W. O. (2009).** Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* **31**, 432-439.
- Fenner, F. (1989).** Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res Virol* **140**, 465-466; discussion 487-491.
- Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z. & Ladnyi, I. D. (1988).** Smallpox and its eradication. Geneva: World Health Organization.
- Fenner, F., Nakano, J.H. (1988).** *Poxviridae*. . New York: Springer-Verlag.
- Fioretti, D., Iurescia, S., Fazio, V. M. & Rinaldi, M. (2010).** DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 174378.
- Flohe, S. B., Bauer, C., Flohe, S. & Moll, H. (1998).** Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite Leishmania major. *Eur J Immunol* **28**, 3800-3811.



- Gaafar, A., Veress, B., Permin, H., Kharazmi, A., Theander, T. G. & el Hassan, A. M. (1999).** Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol* **91**, 314-320.
- Gallego-Gomez, J. C., Risco, C., Rodriguez, D., Cabezas, P., Guerra, S., Carrascosa, J. L. & Esteban, M. (2003).** Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *J Virol* **77**, 10606-10622.
- Garcia-Arriaza, J., Najera, J. L., Gomez, C. E., Tewabe, N., Sorzano, C. O., Calandra, T., Roger, T. & Esteban, M. (2011).** A candidate HIV/AIDS vaccine (MVA-B) lacking vaccinia virus gene C6L enhances memory HIV-1-specific T-cell responses. *PloS one* **6**, e24244.
- Gardner, J. D., Tschärke, D. C., Reading, P. C. & Smith, G. L. (2001).** Vaccinia virus semaphorin A39R is a 50-55 kDa secreted glycoprotein that affects the outcome of infection in a murine intradermal model. *The Journal of general virology* **82**, 2083-2093.
- GeneBank (Gene ID: 3707585).** WR208 Ubiquitin Ligase, Host Defense Modulator, Apoptosis. *GeneBank* **Gene ID: 3707585**.
- Gershon, P. D. (2004).** Studying vaccinia virus RNA processing in vitro. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **269**, 151-168.
- Gicheru, M. M., Olobo, J. O., Anjili, C. O., Orago, A. S., Modabber, F. & Scott, P. (2001).** Vervet monkeys vaccinated with killed *Leishmania major* parasites and interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection. *Infect Immun* **69**, 245-251.
- Gomez, C. E., Abaitua, F., Rodriguez, D. & Esteban, M. (2004).** Efficient CD8+ T cell response to the HIV-env V3 loop epitope from multiple virus isolates by a DNA prime/vaccinia virus boost (rWR and rMVA strains) immunization regime and enhancement by the cytokine IFN-gamma. *Virus Res* **105**, 11-22.
- Gomez, C. E., Najera, J. L., Krupa, M. & Esteban, M. (2008).** The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* **8**, 97-120.
- Gomez, C. E., Najera, J. L., Domingo-Gil, E., Ochoa-Callejero, L., Gonzalez-Aseguinolaza, G. & Esteban, M. (2007).** Virus distribution of the attenuated MVA and NYVAC poxvirus strains in mice. *J Gen Virol* **88**, 2473-2478.
- Gómez, J. C. G. (2003).** *Biología celular de la infección y morfogénesis de mutantes atenuados del virus vaccinia*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Gonzalez, J. M. & Esteban, M. (2010).** A poxvirus Bcl-2-like gene family involved in regulation of host immune response: sequence similarity and evolutionary history. *Virology* **7**, 59.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., Taladriz, S., Marquet, A. & Larraga, V. (1999).** Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *Eur J Biochem* **259**, 909-916.

- Gonzalo, R. M., del Real, G., Rodriguez, J. R., Rodriguez, D., Heljasvaara, R., Lucas, P., Larraga, V. & Esteban, M. (2002). A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the Leishmania infantum P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **20**, 1226-1231.
- Green, S. J., Crawford, R. M., Hockmeyer, J. T., Meltzer, M. S. & Nacy, C. A. (1990). Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* **145**, 4290-4297.
- Gurunathan, S., Sacks, D. L., Brown, D. R., Reiner, S. L., Charest, H., Glaichenhaus, N. & Seder, R. A. (1997). Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with Leishmania major. *J Exp Med* **186**, 1137-1147.
- Guse, K., Cerullo, V. & Hemminki, A. (2011). Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer. *Expert Opin Biol Ther* **11**, 595-608.
- H** Halsell, J. S., Riddle, J. R., Atwood, J. E., Gardner, P., Shope, R., Poland, G. A., Gray, G. C., Ostroff, S., Eckart, R. E. & other authors (2003). Myopericarditis following smallpox vaccination among vaccinia-naïve US military personnel. *Jama* **289**, 3283-3289.
- Hill, A. V., Reyes-Sandoval, A., O'Hara, G., Ewer, K., Lawrie, A., Goodman, A., Nicosia, A., Folgori, A., Colloca, S. & other authors (2010). Prime-boost vectored malaria vaccines: progress and prospects. *Hum Vaccin* **6**, 78-83.
- Hiller, G., Eibl, H. & Weber, K. (1981). Characterization of intracellular and extracellular vaccinia virus variants: N1-isonicotinoyl-N2-3-methyl-4-chlorobenzoylhydrazine interferes with cytoplasmic virus dissemination and release. *J Virol* **39**, 903-913.
- Hinman, A. (1999). Eradication of vaccine-preventable diseases. *Annu Rev Public Health* **20**, 211-229.
- Holaday, B. J., Sadick, M. D., Wang, Z. E., Reiner, S. L., Heinzel, F. P., Parslow, T. G. & Locksley, R. M. (1991). Reconstitution of Leishmania immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1- and Th2-like cell lines. *The Journal of Immunology* **147**, 1653.
- Holzer, G. W. & Falkner, F. G. (1997). Construction of a vaccinia virus deficient in the essential DNA repair enzyme uracil DNA glycosylase by a complementing cell line. *J Virol* **71**, 4997-5002.
- Honeychurch, K. M., Yang, G., Jordan, R. & Hruby, D. E. (2007). The vaccinia virus F13L YPPL motif is required for efficient release of extracellular enveloped virus. *Journal of virology* **81**, 7310-7315.
- Howard, J. G. (1985). Immunological tolerance in BALB/c mice. *Curr Top Microbiol Immunol* **122**, 171-175.
- Howard, J. G. (1986). Immunological regulation and control of experimental leishmaniasis. *Int Rev Exp Pathol* **28**, 79-116.
- Hsiao, J. C., Chung, C. S. & Chang, W. (1999). Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *Journal of virology* **73**, 8750-8761.

- I** Iborra, S., Soto, M., Carrion, J., Nieto, A., Fernandez, E., Alonso, C. & Requena, J. M. (2003). The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect Immun* **71**, 6562-6572.
- J** Jacobs, B. L., Langland, J. O., Kibler, K. V., Denzler, K. L., White, S. D., Holechek, S. A., Wong, S., Huynh, T. & Baskin, C. R. (2009). Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res* **84**, 1-13.
- Jenner, E. (1798). An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western countries of England, particularly near Gloucestershire, and known by the name of the cow pox., pp. 213-240. New York: Camac.
- Jensen, O. N., Houthaave, T., Shevchenko, A., Cudmore, S., Ashford, T., Mann, M., Griffiths, G. & Krijnse Locker, J. (1996). Identification of the major membrane and core proteins of vaccinia virus by two-dimensional electrophoresis. *J Virol* **70**, 7485-7497.
- Jentarra, G. M., Heck, M. C., Youn, J. W., Kibler, K., Langland, J. O., Baskin, C. R., Ananieva, O., Chang, Y. & Jacobs, B. L. (2008). Vaccinia viruses with mutations in the E3L gene as potential replication-competent, attenuated vaccines: scarification vaccination. *Vaccine* **26**, 2860-2872.
- Joklik, W. K. (1962). The purification of four strains of poxvirus. *Virology* **18**, 9-18.
- Julia, V., Rassoulzadegan, M. & Glaichenhaus, N. (1996). Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* **274**, 421.
- K** Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E. & Sacks, D. (2000). Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* **290**, 1351-1354.
- Karkhanis, L. U. & Ross, T. M. (2007). Mucosal vaccine vectors: replication-competent versus replication-deficient poxviruses. *Curr Pharm Des* **13**, 2015-2023.
- Kedzierska, K., Curtis, J. M., Valkenburg, S. A., Hatton, L. A., Kiu, H., Doherty, P. C. & Kedzierski, L. (2012). Induction of protective CD4+ T cell-mediated immunity by a *Leishmania* peptide delivered in recombinant influenza viruses. *PLoS One* **7**, e33161.
- Keesen, T. S., Antonelli, L. R., Faria, D. R., Guimaraes, L. H., Bacellar, O., Carvalho, E. M., Dutra, W. O. & Gollob, K. J. (2011). CD4(+) T cells defined by their Vbeta T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* **165**, 338-351.
- Kelly, B. L., Stetson, D. B. & Locksley, R. M. (2003). *Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. *J Exp Med* **198**, 1689-1698.
- Kenney, R. T., Sacks, D. L., Sypek, J. P., Vilela, L., Gam, A. A. & Evans-Davis, K. (1999). Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* **163**, 4481-4488.

- Khalil, E. A., El Hassan, A. M., Zijlstra, E. E., Mukhtar, M. M., Ghalib, H. W., Musa, B., Ibrahim, M. E., Kamil, A. A., Elsheikh, M. & other authors (2000). Autoclaved *Leishmania* major vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* **356**, 1565-1569.
- Khamesipour, A., Rostami, M. N., Tasbihi, M., Mohammadi, A. M., Shahrestani, T., Sarrafnejad, A., Sohrabi, Y., Eskandari, S. E. & Valian, H. K. (2012). Phenotyping of circulating CD8(+) T cell subsets in human cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect.*
- Kibler, K. V., Gomez, C. E., Perdiguero, B., Wong, S., Huynh, T., Holechek, S., Arndt, W., Jimenez, V., Gonzalez-Sanz, R. & other authors (2011). Improved NYVAC-based vaccine vectors. *PLoS One* **6**, e25674.
- Kidokoro, M., Tashiro, M. & Shida, H. (2005). Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4152-4157.
- Kieny, M. P., Lathe, R., Drillien, R., Spohner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T., Koprowski, H. & Lecocq, J. P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* **312**, 163-166.
- Kolde, G., Luger, T., Sorg, C. & Sunderkotter, C. (1996). Successful treatment of cutaneous leishmaniasis using systemic interferon-gamma. *Dermatology* **192**, 56-60.
- Kovacs, G. R. & Moss, B. (1996). The vaccinia virus H5R gene encodes late gene transcription factor 4: purification, cloning, and overexpression. *Journal of virology* **70**, 6796-6802.
- L** Laddy, D. J. & Weiner, D. B. (2006). From plasmids to protection: a review of DNA vaccines against infectious diseases. *Int Rev Immunol* **25**, 99-123.
- Lainson, R. & Shaw, J. J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In *The leishmaniasis in Biology and Epidemiology*, vol. 1, pp. 1-120. Edited by W. a. K.-K. Peter, R.: Academic Press.
- Lane, J. M., Ruben, F. L., Neff, J. M. & Millar, J. D. (1970). Complications of smallpox vaccination, 1968: results of ten statewide surveys. *J Infect Dis* **122**, 303-309.
- Lange, U. G., Mastroeni, P., Blackwell, J. M. & Stober, C. B. (2004). DNA-Salmonella enterica serovar Typhimurium primer-booster vaccination biases towards T helper 1 responses and enhances protection against *Leishmania* major infection in mice. *Infect Immun* **72**, 4924-4928.
- Launois, P., Pingel, S., Himmelrich, H., Locksley, R. & Louis, J. (2007). Different epitopes of the LACK protein are recognized by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells in H-2b and H-2d mice susceptible to *Leishmania* major. *Microbes and infection* **9**, 1260.
- Launois, P., Maillard, I., Pingel, S., Swihart, K. G., Xenarios, I., Acha-Orbea, H., Diggelmann, H., Locksley, R. M., MacDonald, H. R. & other authors (1997). IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania* major in BALB/c mice. *Immunity* **6**, 541.

- Leon, B., Lopez-Bravo, M. & Ardavin, C. (2007).** Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* **26**, 519-531.
- Li, H. & Durbin, R. (2009).** Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754-1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. & Durbin, R. (2009).** The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078-2079.
- Li, S., Rodrigues, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Palese, P., Nussenzweig, R. S. & Zavala, F. (1993).** Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5214-5218.
- Li, Y., Yuan, S. & Moyer, R. W. (1998).** The non-permissive infection of insect (gypsy moth) LD-652 cells by Vaccinia virus. *Virology* **248**, 74-82.
- Liew, F. Y., Li, Y. & Millott, S. (1990).** Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of Leishmania major through the induction of nitric oxide. *Journal of immunology* **145**, 4306.
- Liew, F. Y., Yang, Y. L. I. J. D. M., Severn, A. & Wellcome, F. E. G. C. O. X. (1991).** TNF- $\alpha$  reverses the disease-exacerbating effect of subcutaneous immunization against murine cutaneous leishmaniasis. *Immunology* **39**, 304.
- Lopez-Fuertes, L., Perez-Jimenez, E., Vila-Coro, A. J., Sack, F., Moreno, S., Konig, S. A., Junghans, C., Wittig, B., Timon, M. & other authors (2002).** DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against Leishmania major infection in mice. *Vaccine* **21**, 247-257.
- Lowrie, D. B., Tascon, R. E., Bonato, V. L., Lima, V. M., Faccioli, L. H., Stavropoulos, E., Colston, M. J., Hewinson, R. G., Moelling, K. & other authors (1999).** Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* **400**, 269-271.
- Lu, S. (2009).** Heterologous prime-boost vaccination. *Curr Opin Immunol* **21**, 346-351.
- Macedo, A. B., Sanchez-Arcila, J. C., Schubach, A. O., Mendonca, S. C., Marins-Dos-Santos, A., de Fatima Madeira, M., Gagini, T., Pimentel, M. I. & De Luca, P. M. (2012).** Multifunctional CD4 T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* **167**, 505-513.
- Mackett, M., Smith, G. L. & Moss, B. (1982).** Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7415-7419.
- McConkey, S. J., Reece, W. H., Moorthy, V. S., Webster, D., Dunachie, S., Butcher, G., Vuola, J. M., Blanchard, T. J., Gothard, P. & other authors (2003).** Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat Med* **9**, 729-735.
- McFadden, G. (2005).** Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* **3**, 201-213.



- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S. & other authors (2010).** The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* **20**, 1297-1303.
- McMahon-Pratt, D., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Zhang, Y., Manson, K., Bergman, C., Rivas, L., Rodriguez, J. F., Lohman, K. L. & other authors (1993).** Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against Leishmania infection. *Infect Immun* **61**, 3351-3359.
- Melby, P. C. (2002).** Vaccination against cutaneous leishmaniasis: current status. *Am J Clin Dermatol* **3**, 557-570.
- Melby, P. C., Yang, J., Zhao, W., Perez, L. E. & Cheng, J. (2001).** Leishmania donovani p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* **69**, 4719-4725.
- Melby, P. C., Ogden, G. B., Flores, H. A., Zhao, W., Geldmacher, C., Biediger, N. M., Ahuja, S. K., Uranga, J. & Melendez, M. (2000).** Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infect Immun* **68**, 5595-5602.
- Meseda, C. A., Garcia, A. D., Kumar, A., Mayer, A. E., Manischewitz, J., King, L. R., Golding, H., Merchlinsky, M. & Weir, J. P. (2005).** Enhanced immunogenicity and protective effect conferred by vaccination with combinations of modified vaccinia virus Ankara and licensed smallpox vaccine Dryvax in a mouse model. *Virology* **339**, 164-175.
- Meyer, H., Sutter, G. & Mayr, A. (1991).** Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* **72 (Pt 5)**, 1031-1038.
- Miller, G. (1957).** *The adoption of inoculation for smallpox in England and France*. Philadelphia: Univer. of Pennsylvania Press.
- Mimori, T., Hashiguchi, Y., Kawabata, M., Gomez, E. A. & De Coronel, V. V. (1987).** The relationship between severity of ulcerated lesions and immune responses in the early stage of cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Ann Trop Med Parasitol* **81**, 681-685.
- Miyahira, Y., Murata, K., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Rodrigues, M. M. & Zavala, F. (1995).** Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J Immunol Methods* **181**, 45-54.
- Mohamed, M. R. & Niles, E. G. (2001).** The viral RNA polymerase H4L subunit is required for Vaccinia virus early gene transcription termination. *The Journal of biological chemistry* **276**, 20758-20765.
- Mooij, P., Balla-Jhaghoorsingh, S. S., Koopman, G., Beenhakker, N., van Haaften, P., Baak, I., Nieuwenhuis, I. G., Kondova, I., Wagner, R. & other authors (2008).** Differential CD4+ versus CD8+ T-cell responses elicited by different poxvirus-based human immunodeficiency virus type 1 vaccine candidates provide comparable efficacies in primates. *J Virol* **82**, 2975-2988.

- Moore, J. B. & Smith, G. L. (1992).** Steroid hormone synthesis by a vaccinia enzyme: a new type of virus virulence factor. *EMBO J* **11**, 1973-1980.
- Moreno, J., Vouldoukis, I., Martin, V., McGahie, D., Cuisinier, A. M. & Gueguen, S. (2012).** Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1683.
- Morsy, T. A., el Okby, L. M., Helmy, O. M., Makarm, S. S. & Essa, M. H. (1987).** The class immunoglobulins versus the histological picture in cutaneous leishmaniasis. *J Egypt Soc Parasitol* **17**, 723-728.
- Moss, B. (1991).** Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* **252**, 1662-1667.
- Moss, B. (1996).** Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11341-11348.
- Moss, B. (2007).** *Poxviridae: the viruses and their replication*, vol. 4<sup>edn</sup>. Philadelphia, Lipincott Williams & Wilkins 2007.
- Moss, B. (2012).** Poxvirus Cell Entry: How Many Proteins Does it Take? *Viruses* **4**, 688-707.
- Mougueau, E., Altare, F., Wakil, a. E., Zheng, S., Coppola, T., Wang, Z. E., Waldmann, R., Locksley, R. M. & Glaichenhaus, N. (1995a).** Expression cloning of a protective Leishmania antigen. *Science* **268**, 563.
- Mougueau, E., Altare, F., Wakil, A. E., Zheng, S., Coppola, T., Wang, Z. E., Waldmann, R., Locksley, R. M. & Glaichenhaus, N. (1995b).** Expression cloning of a protective Leishmania antigen. *Science* **268**, 563-566.
- Muller, I., Pedrazzini, T., Kropf, P., Louis, J. & Milon, G. (1991).** Establishment of resistance to Leishmania major infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells. *Int Immunol* **3**, 587-597.
- N Nagill, R. & Kaur, S. (2011).** Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. *Int Immunopharmacol* **11**, 1464-1488.
- Nájera, J. L., Gómez, C. E., García-Arriaza, J., Sorzano, C. O. & Esteban, M. (2010).** Insertion of vaccinia virus C7L host range gene into NYVAC-B genome potentiates immune responses against HIV-1 antigens. *PLoS one* **5**, e11406-e11406.
- Nateghi Rostami, M., Keshavarz, H., Edalat, R., Sarrafnejad, A., Shahrestani, T., Mahboudi, F. & Khamesipour, A. (2010).** CD8+ T cells as a source of IFN-gamma production in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e845.
- O Ober, B. T., Bruhl, P., Schmidt, M., Wieser, V., Gritschenberger, W., Coulibaly, S., Savidis-Dacho, H., Gerencer, M. & Falkner, F. G. (2002).** Immunogenicity and safety of defective vaccinia virus lister: comparison with modified vaccinia virus Ankara. *J Virol* **76**, 7713-7723.
- Obst, R., van Santen, H. M., Mathis, D. & Benoist, C. (2005).** Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4(+) T cell response. *J Exp Med* **201**, 1555-1565.



- Oie, M. & Ichihashi, Y. (1981a).** Target antigen of vaccinia-infected cells recognized by virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Microbiol Immunol* **25**, 361-375.
- Oie, M. & Ichihashi, Y. (1981b).** Characterization of vaccinia polypeptides. *Virology* **113**, 263-276.
- Okuno, T., Takeuchi, M., Matsumoto, Y. & Otsuka, H. (2002).** Pretreatment of leishmania homologue of receptors for activated C kinase (LACK) promotes disease progression caused by *Leishmania amazonensis*. *Exp Anim* **51**, 335-341.
- OMS (1980).** *The global eradication of smallpox. Final report of the global commission for the certification of smallpox eradication.*, vol. 4. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- P** **P.E.C. Manson-Bahr, B. A. S., A.E.C. Harvey (1963).** Development of Kala-azar in Man after Inoculation with a *Leishmania* from a Kenya Sandfly. *Br Med J* **1**, 1208-1210.
- Paez, E., Dallo, S. & Esteban, M. (1985a).** Generation of a dominant 8-MDa deletion at the left terminus of vaccinia virus DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 3365-3369.
- Paez, E., Dallo, S. & Esteban, M. (1985b).** Generation of a dominant 8-MDa deletion at the left terminus of vaccinia virus DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 3365.
- Palacios, S., Perez, L. H., Welsch, S., Schleich, S., Chmielarska, K., Melchior, F. & Locker, J. K. (2005).** Quantitative SUMO-1 modification of a vaccinia virus protein is required for its specific localization and prevents its self-association. *Mol Biol Cell* **16**, 2822-2835.
- Panicali, D. & Paoletti, E. (1982).** Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 4927-4931.
- Paoletti, E. (1996).** Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11349-11353.
- Papadogiannakis, E., Andritsos, G., Kontos, V., Spanakos, G., Koutis, C. & Velonakis, E. (2010).** Determination of CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood of dogs with leishmaniosis before and after prolonged allopurinol monotherapy. *Vet J* **186**, 262-263.
- Paris, R. M., Kim, J. H., Robb, M. L. & Michael, N. L. (2010).** Prime-boost immunization with poxvirus or adenovirus vectors as a strategy to develop a protective vaccine for HIV-1. *Expert Rev Vaccines* **9**, 1055-1069.
- Pecher, G. (2002).** DNA-based tumor vaccines. *Onkologie* **25**, 528-532.
- Pérez-Jiménez, E., Kochan, G., Gherardi, M. M. & Esteban, M. (2006).** MVA-LACK as a safe and efficient vector for vaccination against leishmaniasis. *Microbes and infection* **8**, 810.
- Perkus, M. E., Tartaglia, J. & Paoletti, E. (1995).** Poxvirus-based vaccine candidates for cancer, AIDS, and other infectious diseases. *J Leukoc Biol* **58**, 1-13.

- Piedrafita, D., Xu, D., Hunter, D., Harrison, R. A. & Liew, F. Y. (1999).** Protective immune responses induced by vaccination with an expression genomic library of *Leishmania major*. *J Immunol* **163**, 1467-1472.
- Pingel, S., Launois, P., Fowell, D. J., Turck, C. W., Southwood, S., Sette, A., Glaichenhaus, N., Louis, J. A. & Locksley, R. M. (1999).** Altered ligands reveal limited plasticity in the T cell response to a pathogenic epitope. *J Exp Med* **189**, 1111-1120.
- Piscopo, T. V. & Mallia, A. C. (2006).** Leishmaniasis. *Postgrad Med J* **82**, 649-657.
- R** **Radosevic, K., Rodriguez, A., Lemckert, A. & Goudsmit, J. (2009).** Heterologous prime-boost vaccinations for poverty-related diseases: advantages and future prospects. *Expert Rev Vaccines* **8**, 577-592.
- Rafati, S., Nakhaee, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Darabi, H., Eravani, D., Sanos, S., Kaye, P., Taghikhani, M. & other authors (2005).** Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine* **23**, 3716-3725.
- Ramiro, M. J., Zarate, J. J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J. A. & Larraga, V. (2003).** Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* **21**, 2474-2484.
- Ramos, I., Alonso, a., Peris, a., Marcen, J. M., Abengozar, M. a., Alcolea, P. J., Castillo, J. a. & Larraga, V. (2009).** Antibiotic resistance free plasmid DNA expressing LACK protein leads towards a protective Th1 response against *Leishmania infantum* infection. *Vaccine* **27**, 6695.
- Ramsburg, E., Rose, N. F., Marx, P. A., Mefford, M., Nixon, D. F., Moretto, W. J., Montefiori, D., Earl, P., Moss, B. & other authors (2004).** Highly effective control of an AIDS virus challenge in macaques by using vesicular stomatitis virus and modified vaccinia virus Ankara vaccine vectors in a single-boost protocol. *J Virol* **78**, 3930-3940.
- Ramshaw, I. A. & Ramsay, A. J. (2000).** The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* **21**, 163-165.
- Ray, P., De, A., Min, J. J., Tsien, R. Y. & Gambhir, S. S. (2004).** Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer Res* **64**, 1323-1330.
- Reed, S. G. & Campos-Neto, A. (2003).** Vaccines for parasitic and bacterial diseases. *Curr Opin Immunol* **15**, 456-460.
- Reiner, S. L. & Locksley, R. M. (1995).** The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* **13**, 151-177.
- Reiner, S. L., Wang, Z. E., Hatam, F., Scott, P. & Locksley, R. M. (1993).** TH1 and TH2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis. *Science* **259**, 1457-1460.

- Reiner, S. L., Fowell, D. J., Moskowitz, N. H., Swier, K., Brown, D. R., Brown, C. R., Turck, C. W., Scott, P. A., Killeen, N. & other authors (1998). Control of *Leishmania major* by a monoclonal alpha beta T cell repertoire. *J Immunol* **160**, 884-889.
- Reis, A. B., Giunchetti, R. C., Carrillo, E., Martins-Filho, O. A. & Moreno, J. (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol* **26**, 341-349.
- Requena, J. M., Iborra, S., Carrion, J., Alonso, C. & Soto, M. (2004). Recent advances in vaccines for leishmaniasis. *Expert Opin Biol Ther* **4**, 1505-1517.
- Resch, W. & Moss, B. (2005). The Conserved Poxvirus L3 Virion Protein Is Required for Transcription of Vaccinia Virus Early Genes. *Journal of virology* **79**, 14719-14729.
- Reyes-Sandoval, A., Harty, J. T. & Todryk, S. M. (2007). Viral vector vaccines make memory T cells against malaria. *Immunology* **121**, 158-165.
- Roberts, K. L. & Smith, G. L. (2008). Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends in microbiology* **16**, 472-479.
- Rodriguez, J. F., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., McGowan, E. B. & Esteban, M. (1988). Expression of the firefly luciferase gene in vaccinia virus: a highly sensitive gene marker to follow virus dissemination in tissues of infected animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 1667-1671.
- Rogers, K. A., DeKrey, G. K., Mbow, M. L., Gillespie, R. D., Brodskyn, C. I. & Titus, R. G. (2002). Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett* **209**, 1-7.
- Roper, R. L. & Moss, B. (1999). Envelope formation is blocked by mutation of a sequence related to the HKD phospholipid metabolism motif in the vaccinia virus F13L protein. *Journal of virology* **73**, 1108.
- Ruska, H. K. (1943). Über Form, Größenverteilung und Struktur einiger Virus-Elementarkörper. *Zbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt* **1**, 311-318.
- S** Sacks, D. & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* **2**, 845-858.
- Sacks, D. & Sher, A. (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* **3**, 1041-1047.
- Sadikot, R. T. & Blackwell, T. S. (2005). Bioluminescence imaging. *Proc Am Thorac Soc* **2**, 537-540, 511-532.
- Sakthianandeswaren, A., Curtis, J. M., Elso, C., Kumar, B., Baldwin, T. M., Lopaticki, S., Kedzierski, L., Smyth, G. K., Foote, S. J. & other authors (2010). Fine mapping of *Leishmania major* susceptibility Lmr2 and evidence of a role for Flt1 in disease and wound healing. *Infect Immun* **78**, 2734-2744.
- Sambrook, J., Fritsch, E. R. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sarov, I. & Joklik, W. K. (1972).** Characterization of intermediates in the uncoating of vaccinia virus DNA. *Virology* **50**, 593-602.
- Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R. L., Pearce, E. & Sher, A. (1988).** Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med* **168**, 1675-1684.
- Sedegah, M., Belmonte, M., Epstein, J. E., Siegrist, C. A., Weiss, W. R., Jones, T. R., Lu, M., Carucci, D. J. & Hoffman, S. L. (2003).** Successful induction of CD8 T cell-dependent protection against malaria by sequential immunization with DNA and recombinant poxvirus of neonatal mice born to immune mothers. *J Immunol* **171**, 3148-3153.
- Seder, R. a., Darrah, P. a. & Roederer, M. (2008).** T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature reviews Immunology* **8**, 247.
- Senekji, H. A. & Beattie, C. P. (1941).** Artificial infection and immunization of man with cultures of *Leishmania tropica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **34**, 415-419.
- Senkevich, T. G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G. E. & Moss, B. (2005).** Poxvirus multi-protein entry-fusion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 18572-18577.
- Sharifi, I., FeKri, A. R., Aflatonian, M. R., Khamesipour, A., Nadim, A., Mousavi, M. R., Momeni, A. Z., Dowlati, Y., Godal, T. & other authors (1998).** Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet* **351**, 1540-1543.
- Singh, B. & Sundar, S. (2012).** Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* **30**, 3834-3842.
- Smadel, J. E. & Hoagland, C. L. (1942).** Elementary Bodies of *Vaccinia*. *Bacteriol Rev* **6**, 79-110.
- Smooker, P. M., Rainczuk, A., Kennedy, N. & Spithill, T. W. (2004).** DNA vaccines and their application against parasites - promise, limitations and potential solutions. *Biotechnol Annu Rev* **10**, 189-236.
- Soloski, M. J. & Holowczak, J. A. (1981).** Characterization of supercoiled nucleoprotein complexes released from detergent-treated vaccinia virions. *J Virol* **37**, 770-783.
- Soussi, N., Saklani-Jusforgues, H., Colle, J. H., Milon, G., Glaichenhaus, N. & Goossens, P. L. (2002).** Effect of intragastric and intraperitoneal immunisation with attenuated and wild-type LACK-expressing *Listeria monocytogenes* on control of murine *Leishmania major* infection. *Vaccine* **20**, 2702-2712.
- Spath, G. F., Lye, L. F., Segawa, H., Turco, S. J. & Beverley, S. M. (2004).** Identification of a compensatory mutant (lpg2-REV) of *Leishmania major* able to survive as amastigotes within macrophages without LPG2-dependent glycoconjugates and its significance to virulence and immunization strategies. *Infect Immun* **72**, 3622-3627.

- Stebut, E. v. (2007).** Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Experimental Dermatology* **16**, 340-346.
- Stern, W. & Dales, S. (1974).** Biogenesis of vaccinia: concerning the origin of the envelope phospholipids. *Virology* **62**, 293-306.
- Strauss, J. H., Strauss, E. G. (2002).** *Overview of viruses and virus infection* San Diego: Academic Press: A.Press.
- Symons, J. A., Adams, E., Tschärke, D. C., Reading, P. C., Waldmann, H. & Smith, G. L. (2002).** The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model. *J Gen Virol* **83**, 2833-2844.
- T Tagaya, I., Kitamura, T. & Sano, Y. (1961).** A new mutant of dermovaccinia virus. *Nature* **192**, 381-382.
- Titus, R. G., Gueiros-Filho, F. J., de Freitas, L. A. & Beverley, S. M. (1995).** Development of a safe live Leishmania vaccine line by gene replacement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10267-10271.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Traktman, P. (1991).** Molecular genetic and biochemical analysis of poxvirus DNA replication. *Semin Virol* **2**, 291-304.
- U Unterholzner, L., Sumner, R. P., Baran, M., Ren, H., Mansur, D. S., Bourke, N. M., Randow, F., Smith, G. L. & Bowie, A. G. (2011).** Vaccinia virus protein C6 is a virulence factor that binds TBK-1 adaptor proteins and inhibits activation of IRF3 and IRF7. *PLoS Pathog* **7**, e1002247.
- Uzonna, J. E., Joyce, K. L. & Scott, P. (2004a).** Low dose Leishmania major promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med* **199**, 1559-1566.
- Uzonna, J. E., Wei, G., Yurkowski, D. & Bretscher, P. (2001).** Immune elimination of Leishmania major in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease. *J Immunol* **167**, 6967-6974.
- Uzonna, J. E., Spath, G. F., Beverley, S. M. & Scott, P. (2004b).** Vaccination with phosphoglycan-deficient Leishmania major protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response. *J Immunol* **172**, 3793-3797.
- V Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Garfield, M. K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E. D., Sacks, D. L. & Ribeiro, J. M. (2001).** Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* **194**, 331-342.
- Vanderplasschen, A. & Smith, G. L. (1997).** A novel virus binding assay using confocal microscopy: demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors. *J Virol* **71**, 4032-4041.



- Verardi, P. H., Jones, L. A., Aziz, F. H., Ahmad, S. & Yilma, T. D. (2001).** Vaccinia virus vectors with an inactivated gamma interferon receptor homolog gene (B8R) are attenuated In vivo without a concomitant reduction in immunogenicity. *J Virol* **75**, 11-18.
- Veras, P., Brodskyn, C., Balestieri, F., Freitas, L., Ramos, A., Queiroz, A., Barral, A., Beverley, S. & Barral-Netto, M. (1999).** A dhfr-ts- *Leishmania* major knockout mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94**, 491-496.
- Vijayan, A., Gomez, C. E., Espinosa, D. A., Goodman, A. G., Sanchez-Sampedro, L., Sorzano, C. O., Zavala, F. & Esteban, M. (2012).** Adjuvant-like effect of vaccinia virus 14K protein: a case study with malaria vaccine based on the circumsporozoite protein. *J Immunol* **188**, 6407-6417.
- Vijaysri, S., Jentarra, G., Heck, M. C., Mercer, A. A., McInnes, C. J. & Jacobs, B. L. (2008).** Vaccinia viruses with mutations in the E3L gene as potential replication-competent, attenuated vaccines: intra-nasal vaccination. *Vaccine* **26**, 664-676.
- Volf, P., Hajmova, M., Sadlova, J. & Votypka, J. (2004).** Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *Int J Parasitol* **34**, 1221-1227.
- Vuola, J. M., Keating, S., Webster, D. P., Berthoud, T., Dunachie, S., Gilbert, S. C. & Hill, A. V. (2005).** Differential immunogenicity of various heterologous prime-boost vaccine regimens using DNA and viral vectors in healthy volunteers. *J Immunol* **174**, 449-455.
- W** **Weyer, J., Rupprecht, C. E., Mans, J., Viljoen, G. J. & Nel, L. H. (2007).** Generation and evaluation of a recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine for rabies. *Vaccine* **25**, 4213-4222.
- WHO (2010).** Control of the leishmaniases. *Who Technical Report Series* **949**.
- Wilcock, D., Duncan, S. A., Traktman, P., Zhang, W. H. & Smith, G. L. (1999).** The vaccinia virus A4OR gene product is a nonstructural, type II membrane glycoprotein that is expressed at the cell surface. *J Gen Virol* **80 (Pt 8)**, 2137-2148.
- X** **Xin, L., Wanderley, J. L., Wang, Y., Vargas-Inchaustegui, D. A. & Soong, L. (2011).** The magnitude of CD4(+) T-cell activation rather than TCR diversity determines the outcome of *Leishmania* infection in mice. *Parasite Immunol* **33**, 170-180.
- Yang, Z., Reynolds, S. E., Martens, C. A., Bruno, D. P., Porcella, S. F. & Moss, B. (2011).** Expression profiling of the intermediate and late stages of poxvirus replication. *J Virol* **85**, 9899-9908.
- Y** **Zavala, F., Rodrigues, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Nussenzweig, R. S. & Esteban, M. (2001).** A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8(+) T cells. *Virology* **280**, 155-159.
- Z** **Zhu, W., Fang, Q., Zhuang, K., Wang, H., Yu, W., Zhou, J., Liu, L., Tien, P., Zhang, L. & other authors (2007).** The attenuation of vaccinia Tian Tan strain by the removal of the viral M1L-K2L genes. *J Virol Methods* **144**, 17-26.





Anexo  
Anexo  
Anexo  
Anexo

8

